

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg  
(Direktor: Prof. Dr. HANS SCHAEFER)

## Auflichtmikroskopie und Histologie der Tubulusdimensionen bei verschiedenen Diuresezuständen\*

Von

**M. STEINHAUSEN, I. IRAVANI, G. E. SCHUBERT und R. TAUGNER**

unter Mitarbeit von

**A. BRAUN, H. v. EGIDY, F. P. ROHMANN und G. TAUGNER**

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Dezember 1962)

BRODIE und MACKENZIE hatten 1914 an formolfixierten Nierenschnitten von Katzen charakteristische Unterschiede der Tubulusdimensionen in Abhängigkeit vom Funktionszustand gefunden. Nach Injektion von Sulfat, Harnstoff oder Glucose waren z. B. die distalen Lumendurchmesser um den Faktor 2,28, die proximalen Lumendurchmesser um den Faktor 37 vergrößert. Der gesamte (äußere) Durchmesser der Tubuli war dagegen nur im distalen Bereich (um den Faktor 1,41) vermehrt. BRODIE nahm an, daß diese Veränderungen der Nierenmorphologie bei osmotischer Diurese durch Erhöhung des Druckes „in der durch das Glomerulumepithel sezernierten Flüssigkeit“ entstanden waren; je nach dem Verhalten der Wandstärke sollte diese Druckerhöhung im Bereich des distalen Konvoluts zur Querdehnung im Bereich des — in transversaler Richtung weniger nachgiebigen — proximalen Konvoluts vor allem zur Längsdehnung der Tubuli geführt haben.

BRUNNER u. Mitarb. fanden 1957 nach Mannit- und Sulfatgaben an carnoyfixierten Nierenschnitten der Ratte Erweiterungen der proximalen Tubuluslumina um den Faktor 2—3, der distalen Tubuluslumina, dünnen Henleschen Schleifen und kleinen Sammelrohre um den Faktor 1,5. Ursache der Lumenerweiterung — bei nicht signifikant abweichender Querschnittsfläche des Tubulusepithels — soll auch nach BRUNNER u. Mitarb. die inzwischen von WIRZ sowie GOTTSCHALK u. MYLLE sichergestellte Erhöhung des intratubulären Drucks sein. Da Kochsalz und Glucose trotz ähnlicher Diuresesteigerung keine histologischen Veränderungen erzeugten, zogen BRUNNER u. Mitarb. verschiedene Wirkungsmechanismen osmotischer Diuretica in Erwägung.

BOHLE u. Mitarb. untersuchten die Nierenmorphologie von Ratten und Mäusen nach Zufuhr von Mannit, Saccharose, Sulfat und Harnstoff; sie kamen — bei Verwendung der Helly-Fixierung — im Prinzip zwar zu ähnlichen Unterschieden zwischen Antidiurese und osmotischer Diurese, fanden im einzelnen aber auch wesentliche Abweichungen von den oben angeführten Ergebnissen.

Die vorliegenden Untersuchungen drängten sich durch unsere weitgehend morphologisch ausgerichteten Versuche mit der Gefrierschnitt-Autoradiographie unter Verwendung osmotischer Diurese und „stop-flow“ auf. Sie erstreckten sich

\* Die Versuche wurden — als methodische Grundlage unserer Gefrierschnitt-Autoradiographie der Niere — vom Bundesministerium für Atomkernenergie unterstützt. Für Photomaterial und Besoldung einer technischen Assistentin bei der Auflichtmikrophotographie sind wir der Berufsgenossenschaft Feinmechanik und Elektrotechnik zu Dank verpflichtet.

— mit Unterbrechungen — auf einen Zeitraum von 3 Jahren und gingen ursprünglich von Beobachtungen und Überlegungen aus, die mit den erwähnten histologischen Befunden nicht in Einklang zu bringen waren. So erschienen die proximalen Tubuluslumina von Kontrollratten im Auflichtmikroskop wesentlich weiter als im histologischen Schnitt und keinesfalls „kollabiert“; außerdem sollte osmotische Diurese nach den beiläufigen auflichtmikroskopischen Beobachtungen von GOTTSCHALK u. MYLLE zu einer besonders deutlichen Zunahme der distalen und nicht — wie im histologischen Bild — der proximalen Tubuluslumina führen. Weiterhin konnte die Erklärung der histologisch festgestellten, exzessiven Erweiterung proximaler Lumina bei osmotischer Diurese nicht befriedigen: War diese reell und tatsächlich durch Tubulusdehnung infolge Erhöhung des intratubulären Drucks bedingt, so hätte man erwarten sollen, daß der Tubulusurin bei Entnahme oder gar Durchtrennung der Nieren, d.h. bei weitgehendem Druckausgleich, mit nachträglichem „Tubuluskollaps“ postmortal über das Nierenbecken oder die Schnittstellen abfloss. Schließlich kommen beim akuten Nierenversagen Lumenerweiterungen wahrscheinlich auch ohne intratubuläre Drucksteigerung vor (Literatur bei BOHLE u. Mitarb.). Diesen Überlegungen zufolge sollten die tatsächlichen Veränderungen der Tubulusdimensionen bei osmotischer Diurese *in vivo* am Beispiel subkapsulärer Tubuli contorti I und II ermittelt und mit denen an Paraffin- und Gefrierschnitten verglichen werden. Die Zuverlässigkeit histologischer Methoden war allerdings nicht ohne weiteres von den Ergebnissen der Auflichtmikroskopie *in vivo* aus zu beurteilen; neben einer Kritik der auflichtmikroskopischen Bestimmung von Tubulusdimensionen waren vor allem die postmortalen Veränderungen zu untersuchen, mit dem Ziel, ein möglichst lückenloses Bild der Nierenoberfläche vom Zustand *in vivo* über die Nierenentnahme bis zum Zeitpunkt von Fixierung oder Einfrieren zu gewinnen. Das letztere Versuchsziel war für uns vor allem auch im Hinblick auf mögliche Fehlerquellen bei der Gefrierschnitt-Autoradiographie von Interesse.

Im Verlauf unserer Versuche wurden dann die später ausführlich zu besprechenden Ergebnisse von SWANN, HANSSEN sowie THURAU u. DEETJEN bekannt, die — zur Erzielung eines übersichtlichen Gesamtbildes — in einzelnen Punkten ergänzt oder nachgeprüft wurden.

### Versuchsanordnung

Versuchstiere waren Wistar-Ratten von 70—410 g und Katzen von 2,5—2,8 kg.

Die Ratten erhielten eine Standarddiät und bis 1 Std vor der Narkose Wasser ad libitum. Sie wurden mit 60 mg/kg Nembutal i.p. narkotisiert, in Rückenlage auf einem geheizten Operationstisch fixiert, mit einer Trachealkanüle und — je nach Versuchsplan — mit einem Ureterenkatheter versehen. Infusionen erfolgten in die linke Jugularvene. Nach einem Median-schnitt wurde die linke Niere freigelegt und — wie zur Mikropunktion üblich — in einem kleinen Metallöffel mittels Wattetupfern fixiert. Zur gelegentlichen Mikropunktion dienten angeschliffene Quarzkapillaren mit einem Außendurchmesser von 15  $\mu$ . So wurden z. B. die distalen Tubuli durch Injektion von Indigocarmin in proximale Tubusschlingen identifiziert<sup>1</sup>. Die Aortenabklemmung erfolgte oberhalb der Nierenarterien mit einer Fadenschlinge gegen den Widerstand des diese Schlinge führenden, endständig gefensterten Metallzyinders.

Zur Auflichtbeobachtung und -photographie dienten — nach Auffüllen der Bauchhöhle mit physiologischer Kochsalzlösung oder körperwarmem, flüssigem Paraffin — die Ultropak-

<sup>1</sup> In späteren Versuchen wurden die distalen Tubuli durch intravenöse Injektion von 0,3 ml einer 10%igen Lissaminlösung/kg identifiziert (STEINHAUSEN).

Objektive  $6,5 \times$ ,  $11 \times$  und  $22 \times$  (Leitz) mit Tauchkappe. Als Lichtquelle für die Aufnahmen wurde das Blitzgerät Ukatron UN 60 (Zeiss) verwendet. Die linke Niere wurde — besonders für die lokale Anfärbung der proximalen Tubuli mit Methylenblau — meist dekapsuliert. Diese Methylenblaufärbung *in vivo* (Applikation einer 1%igen Lösung mit kleinen Wattetupfern für 3—5 min) diente zur Darstellung der äußeren Tubuluszirkumferenz an der kontrastärmeren, ausgebluteten Niere.

Die Bestimmung der Tubulusdimensionen wurde am Positiv der Auflichtphotogramme bei 130facher Endvergrößerung mit Reduktionszirkel und Eichmaßstab vorgenommen. Aus jeder Aufnahme berücksichtigen wir mindestens 10 proximale Tubuli; die — geringere — Anzahl distaler Tubuli ist jeweils im Text angegeben. Für diese Tubuli wurde — bei der ausgebluteten Niere an Hand vorhergehender Färbung mit Methylenblau — der Gesamtdurchmesser und — soweit am reflektierenden Bürstensaum erkennbar — der Lumendurchmesser bestimmt. Aus beiden konnte jeweils die „Querschnittsfläche des Tubulusepithels“ errechnet werden. In einzelnen Versuchen bestimmten wir — in Abhängigkeit vom Funktionszustand — an markanten Punkten der Außenkontur gestreckt verlaufender Tubulusabschnitte auch die Veränderungen proximaler und distaler Tubuli in longitudinaler Richtung.

In acht Versuchen wurde die excidierte linke Niere — nach einem Aufenthalt von 5 min in physiologischer Kochsalzlösung zwecks Auflichtphotographie — in Aceton-CO<sub>2</sub> eingefroren und zur Herstellung von Gefrierschnitten verwendet. In einem weiteren Versuch erfolgte das Einfrieren — nach entsprechenden Auflichtaufnahmen — schon *in situ*. Behandlung und Auswertung der Gefrierschnitten entsprachen denen bei der Katze.

Die Versuchsanordnung an den 70—80 g schweren Ratten wurde so gewählt, daß unsere Ergebnisse mit denen von BRUNNER u. Mitarb. sowie BOHLE u. Mitarb. an Paraffinschnitten vergleichbar waren.

An Katzen wurde eine Versuchsserie A mit Auflichtbeobachtung durchgeführt; zwei weitere (B und C) dienten dem Vergleich verschiedener histologischer Verfahren bei möglichst breiter Variation der Diurese. Als Narkosemittel verwendeten wir nach 12ständiger Nahrungs- und Wasserkarenz in allen Versuchen Chloralose und Urethan (60 bzw. 480 mg/kg i.p.).

Präparation und Versuchsanordnung für die Auflichtmikroskopie (Versuchsserie A) entsprachen denen bei der Ratte; die dicke Nierenkapsel mußte hier allerdings in jedem Fall auf einer Fläche von etwa 1 cm<sup>2</sup> zwischen Kapselgefäßen gefenstert werden.

In den Versuchsserien B und C war außerdem eine Carotis zur Blutentnahme präpariert und die Messung der Diurese erfolgte — nach Ligatur der Urethra — über einen in die Harnblase eingebundenen, mehrfach perforierten Glaskolben mit angeschlossenem Polyäthylenenschlauch.

Aus Versuchsserie B mit breiter Variation der Diurese sind in Tabelle I 19 Katzen aufgeführt. Bei sechs Tieren wurden die Nieren 15—30 min nach Beendigung der Präparation ohne Infusion, d. h. im Zustand der Antidiurese, entnommen. Bei den übrigen 13 Katzen wurde als Grundinfusion bis zur Nierenentnahme physiologische Kochsalzlösung mit einer Geschwindigkeit von 0,75 ml/kg/min intravenös zugeführt. Hatte die Diurese dabei — nach 20—240 min — einen Wert von 0,16—0,4 ml/kg/min erreicht, so wurden für die letzten 30 min je nach Versuchsplan verschiedene, zusätzliche Infusionen gegeben (vgl. Legende Tabelle I).

Die anschließende Nierenentnahme bestand meist in der möglichst raschen Excision beider Nieren zwischen je zwei Hilusligaturen; eine Niere wurde in der Regel ohne Öffnung der Ligatur in Aceton-CO<sub>2</sub> eingefroren und zur Herstellung von Gefrierschnitten verwendet, aus der zweiten entnahmen wir etwa 0,5—1 cm dicke Scheiben zur Fixierung in Hellyscher Lösung. Zur Kontrolle wurden außerdem noch folgende Varianten der Gewebsentnahme erprobt: Bei fünf Katzen Fixierung von Gewebsblöcken aus Nieren ohne vorhergehende Hilusligatur; in je einem Versuch mit Mannit- und Saccharose-Diurese Helly-Fixierung einer (abgebundenen) Niere *in toto* und Einfrieren sowie Fixierung 5 mm dicker Scheiben aus der anderen (bei der Entnahme ebenfalls abgebundenen) Niere. Die Ergebnisse waren dabei von der Entnahmetechnik nicht abhängig, so daß sich entsprechende Differenzierungen in Tabelle I erübrigen. Auch Einfrieren der excidierten oder noch *in situ* befindlichen Niere mit flüssiger Luft war bei Katzen mit Mannit-Diurese, die wegen abweichender Tiergewichte nicht in Tabelle I aufgenommen wurden, ohne deutlichen Einfluß auf die Ergebnisse.

Versuchsserie C (zum Vergleich verschiedener histologischer Verfahren) bestand aus drei Katzen. Das Infusionsschema entsprach dem von Serie B; Einzelheiten sind der Legende

Tabelle 1

Anzahl der Tiere	Versuchsart	Diurese ml/kg/min	Tubulus contortus I											
			Gesamtdurchmesser ( $\mu$ )			Lumendurchmesser ( $\mu$ )			Querschnittsfläche ( $\mu^2$ )					
			P	N	F	P	N	F	P	N	F	P	N	F
<i>Histologische</i>														
a	6	Antidiuretische Kontrolltiere	48,0 ± 1,5	53,8 ± 2,2	55,0 ± 2,3	6,2 ± 0,9	0	0	1780 ± 100	2270 ± 200	2360 ± 220			
b	4	Mannitinfusion 1,46 15%	* ± 0	43,8 ± 1,6	56,6 ± 2,0	59,3 ± 0,9	*** ± 2,2	*** ± 1,8	18,3 ± 1,8	1235 ± 15	1540 ± 35	2500 ± 140		
c	4	Saccharose-infusion, 30 %	0,98 ± 6,1	50,6 ± 3,2	59,9 ± 4,5	62,2 ± 4,6	** ± 2,8	*** ± 3,7	36,0 ± 3,7	24,7 ± 325	1570 ± 160	1800 ± 160	2560 ± 305	
d	2	Clearance-versuch	0,26 0,28	46,0 42,5	53,2 56,6	57,6 56,2	14,2 13,4	29,2 0	0	1500 1280	1550 2520	2600 2470		
e	1	Mannit-infusion, 5 %	0,65	49,2	53,1	56,6	19,6	31,2	0	1600	1450	2520		
f	1	Tyrodeinfusion	1,0	39,2		49,8 52,5	15,8		4,7 23,7	1010		1930	1720	
<i>Auflichtmikroskopische Ergebnisse</i>														
g	3	Antidiuretische Kontrolltiere <i>in vivo</i>	0,1		48,8 ± 0,9			17,2 ± 0,7			1650 ± 90			
h	3	Antidiuretische <sup>1</sup> Kontrolltiere bei Aortenabklemmung oder Hilusdurchtrennung			45,4 ± 0,9			0			1620 ± 70			
i	2	Mannitinfusion in vivo, 15 %	3,1		57,6 54,5			27,7 25,7			2020 1810			
k	2	Mannitinfusion <sup>2</sup> , 15 % bei Aortenabklemmung			53,0 48,4			23,0 17,2			1785 1610			

<sup>1</sup> Bei zwei Tieren Aufnahmen nach Aortenabklemmung für  $2\frac{1}{2}$ — $2\frac{3}{4}$  min, bei einem Tier Aufnahme 6 min nach Hilusdurchtrennung.

<sup>2</sup> Dauer der Abklemmung 2 und  $2\frac{1}{2}$  min.

von Tabelle 2 zu entnehmen. Je eine Niere dieser Tiere wurde mit, die andere ohne Hilusligatur entnommen. Aus der Niere ohne Ligatur wurden 4—5 mm dicke Scheiben hergestellt und a) zur Fixierung (in Hellyscher Lösung oder absolutem Alkohol) bzw. b) zum Einfrieren mittels CO<sub>2</sub>-Schnee (und damit zur Herstellung von Gefrierschnitten oder zur Durchführung der „freeze-substitution“ mit absolutem Alkohol) verwendet. Die abgebundene Niere wurde *in toto* eingefroren und nach b) verarbeitet.

Die Fixierung in Hellyscher Lösung (Versuchsserie B und C) oder absolutem Alkohol (Versuchsserie C) dauerte etwa 3 Std. Zur „freeze-substitution“ wurde der Block bei —20° C in absolutem Alkohol, der zehnmal gewechselt wurde, über 5 Tage entwässert. In beiden Fällen wurden 10  $\mu$  dicke Paraffinschnitte hergestellt und nach Goldner Trichrom bzw. mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Tabelle 1

Pars recta			Helleische Schleife (pars recta) Gesamtdurchmesser ( $\mu$ )	Tubulus contortus II												
Gesamt-durch-messer ( $\mu$ )	Lumen-durch-messer ( $\mu$ )	Quer-schnitts-fläche ( $\mu^2$ )		Gesamtdurch-messer ( $\mu$ )			Lumendurch-messer ( $\mu$ )			Querschnitts-fläche ( $\mu^2$ )						
				P	P	P	P	N	F	P	N	F	P	N	F	
<i>Ergebnisse</i>																
47,6 ± 0,9	12,3 ± 1,1	1660 ± 86	14,2 ± 0,8	32,6 ± 1,8	23,1 ± 0,9	38,5 ± 0,7	15,9 ± 1,2	15,4 ± 0,8	4,4 ± 0,9	640 ± 65	230 ± 30	1135 ± 50				
46,8 ± 0,8	22,2 ± 1,0	1330 ± 87	19,0 ± 1,7	33,3 ± 0,7	27,1 ± 1,0	48,2 ± 1,5	20,9 ± 0,9	18,5 ± 0,9	26,2 ± 1,9	525 ± 30	310 ± 30	1280 ± 50				
47,6 ± 5,2	23,6 ± 5,1	1340 ± 200	16,5 ± 0,7	32,1 ± 3,3	27,8 ± 3,2	46,0 ± 1,3	20,6 ± 3,4	21,9 ± 2,3	30,6 ± 2,0	480 ± 60	230 ± 80	925 ± 35				
51,7 45,0	15,2 16,7	1920 1380	15,2 15,1	33,8 35,6	42,0 35,4	46,0 52,0	17,4 18,9	31,1 25,2	24,2 31,9	670 720	620 490	1200 1330				
52,4	18,6	1880	19,5	37,7	34,6	46,0	22,5	20,2	25,2	720	620	1160				
47,2	23,8	1305	14,1	30,6		42,9	17,6		13,8	490		1270				

Mittelwerte und mittlere Fehler von Tubulusdimensionen an 28 Katzen im Gewicht von 2,5—2,8 kg bei verschiedenen Diuresezuständen.

a—f: Meßergebnisse nach histologischer Aufarbeitung; g—k: Meßergebnisse bei Auflichtphotographie *in vivo*. P = Paraffinschnitte nach Helly-Fixierung; N = „native“ Gefrierschnitte; F = gefärbte Gefrierschnitte.

Bei den Paraffinschnitten wurden jeweils 10—20 Tubuli planimetrisch ausgemessen. Bei den Gefrierschnitten und im Auflichtmikroskop bestimmten wir jeweils mindestens zehn Gesamt- und Lumendurchmesser und berechneten aus den Mittelwerten die jeweiligen Querschnittsflächen des Epithels. Bei d, i und k sind jeweils die Ergebnisse an zwei einzelnen Versuchstieren angegeben.

Nach der in der Methodik angegebenen Grundinfusion von 0,75 ml/min 0,9%iger Kochsalzlösung/kg erhielten die Tiere der Gruppe b und i (bzw. k) eine intravenöse Stoßinjektion von 1,5 g/kg Mannit in 20%iger Lösung und anschließend bis zur Nierenentnahme für 30 min 300 mg/kg Mannit pro min in 15%iger Lösung. Bei Gruppe c wurde (annähernd isomolar zu b) die doppelte Menge Saccharose injiziert bzw. infundiert. Die Tiere der Gruppe d erhielten zur Grundinfusion einen Zusatz von 0,75 mg Inulin und 1,5—3,0 mg Kreatinin/kg/min. Tier e erhielt in 5%iger Lösung 250 mg/kg Mannit als Stoß und anschließend für 30 min 50 mg/kg Mannit pro min. Bei Tier f wurden 33 ml/kg Tyrodelösung als Stoßinjektion und anschließend für 30 min 6,5 ml/kg/min der gleichen Lösung intravenös gegeben. Die P-Werte von b und c (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , keine Angabe ==  $p > 0,05$ ) beziehen sich jeweils auf den Unterschied zwischen Antidiurese und Mannit- bzw. Saccharosediurese (a/b bzw. a/c).

Die im „Kryostaten“ bei  $-20^\circ\text{C}$  gewonnenen, ebenfalls 10  $\mu$  dicken Gefrierschnitte wurden in Serie B und C, wie auch bei den Ratten, als „gefärbte“ Gefrierschnitte nach den Angaben von TAUGNER u. Mitarb. behandelt, jedoch in Sublimat-Alkohol fixiert und nach PASSINI gegengefärbt. In Versuchsserie B wurden neben diesen „gefärbten“ Gefrierschnitten weitere in ungefärbtem Zustand (ohne Einschlüssemedium oder nach Abdeckung mit Glycerin oder Xylol) bei  $-20^\circ\text{C}$  in einem „Mikroskopkryostaten“ mit der Phasenkontrastoptik photographiert („native“ Gefrierschnitte“, vgl. TAUGNER u. Mitarb.). Da die verwendeten Einschlüssemedien die Ergebnisse nicht deutlich beeinflußten, wurden die Tubulusdimensionen der „nativen“ Gefrierschnitte“ für je eine Niere gemittelt.

Bei den Paraffinschnitten wurden die jeweiligen Gesamt- und Lumendurchmesser aus der planimetrischen Bestimmung der entsprechenden Flächen berechnet (vgl. BOHLE u. Mitarb.). Dabei wurden jeweils zehn Werte pro Kanälchenabschnitt und Niere gemittelt. Bei den

gefärbten Gefrierschnitten von Ratten sowie Versuchsserie A, B und C an Katzen erfolgte die Auswertung mit dem Okularmikrometer. Es wurden jeweils zwei senkrecht zueinander stehende Gesamt- und Lumendurchmesser an quer getroffenen Tubuli bestimmt und gemittelt; pro Kanälchenabschnitt und Niere wurden dann je 10—20 dieser Einzeldaten zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Bei den „nativen Gefrierschnitten“ der Serie B enthalten die Mittelwerte — wie beim Auflichtphotogramm — 10—20 mit dem Reduktionszirkel gewonnene Einzelmessungen. Bei allen diesen Auswertungen wurde die berücksichtigte Nierenpartie nach Zufallskriterien ausgewählt und auch sonst — etwa durch Ausschluß der Zone mit „Randschädigung“ und durch Berücksichtigung regionaler Verschiedenheit nach Einfrieren mit  $\text{CO}_2$ -Aceton — dafür Sorge getragen, daß die angegebenen Werte für die betreffende Niere repräsentativ waren.

#### Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse bei *Antidiurese* und *Infusion hypertonischer Lösungen* an Katzen sind in Tabelle 1, die Ergebnisse an kleinen Ratten in Tabelle 3 enthalten. Ganz allgemein gilt, daß die verschiedenen *histologischen Verfahren* bei den

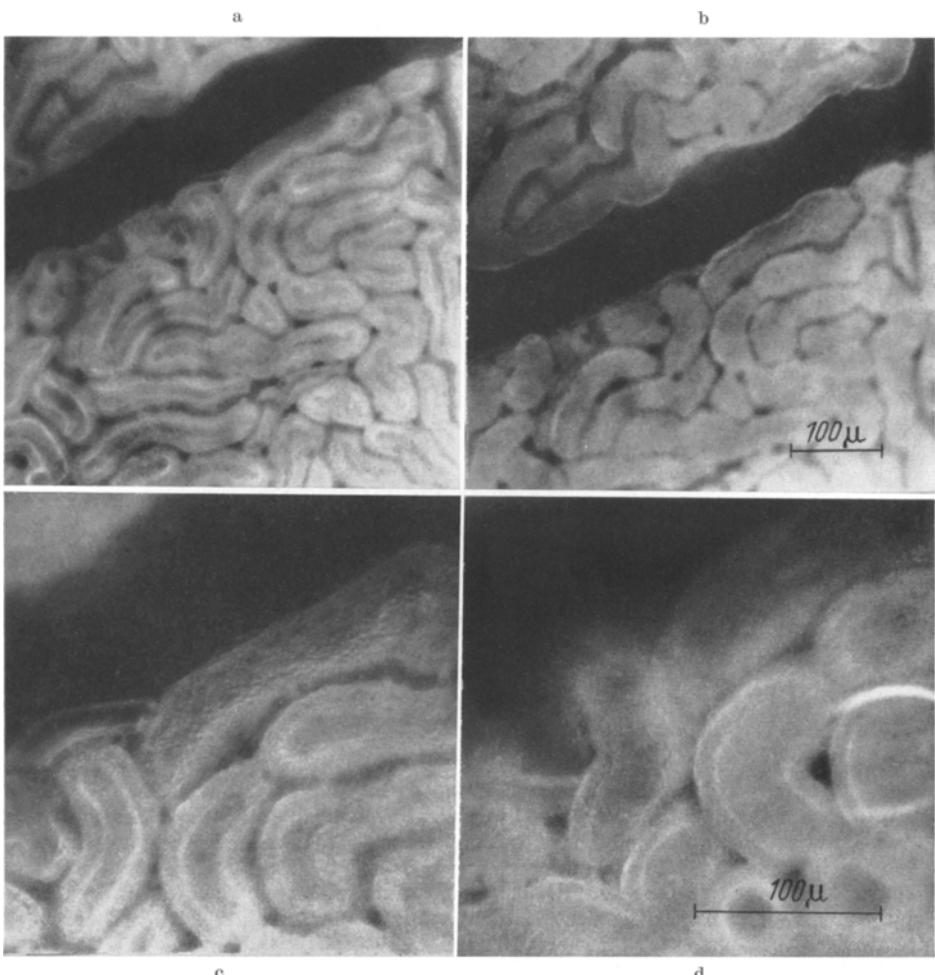


Abb. 1a—d. Auflicht-Mikrophotogramme der Nierenoberfläche einer 2,5 kg schweren Katze nach partieller Dekapsulation. a Antidiurese vor; b  $\frac{1}{4}$  min nach Aortenabklemmung; c Ausschnitt von 1a bei Antidiurese und stärkerer Vergrößerung; d gleicher Ausschnitt unter Mannitdiurese,  $1\frac{1}{2}$  min nach Beginn der Mannitolinfusion (s. Methodik)

gleichen Tieren oder Tiergruppen häufig (und besonders auffallend im distalen Bereich) zu beträchtlich voneinander abweichenden Tubulusdimensionen führten. Trotz dieser Unterschiede von Methode zu Methode finden sich bei osmotischer Diurese im Rahmen der einzelnen histologischen Verfahren auch prinzipiell

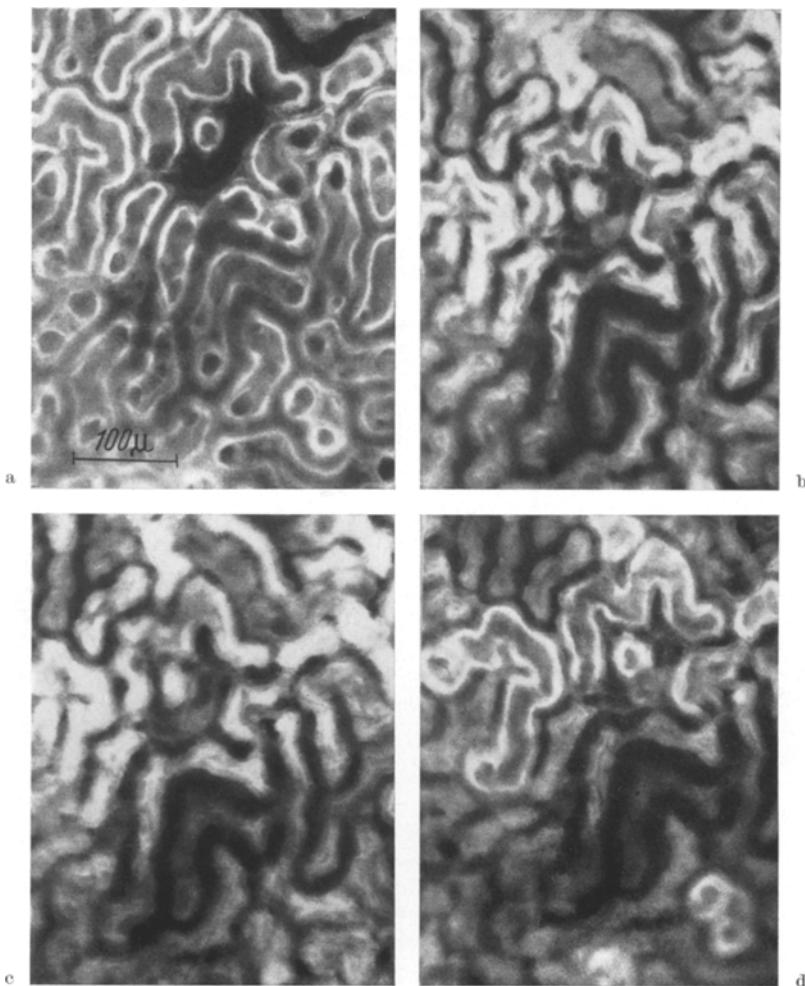


Abb. 2a—d. Auflicht-Mikrophotogramme der Nierenoberfläche einer 310 g schweren, männlichen Ratte bei Antidiurese. In Abb. 2a sind die Lumina zweier distaler Tubuli nach Lissamin-Stoßinjektion dunkel gefärbt. Abb. 2b zeigt den gleichen Ausschnitt  $\frac{1}{2}$  min, Abb. 2c  $2\frac{1}{2}$  min nach Aortenabklemmung, Abb. 2d 1 min nach Wiedereröffnung der insgesamt 3,5 min geschlossenen Aortenklemme

ähnliche Abweichungen vom Kontrollwert, vor allem in der Lumenweite: Die Lumendurchmesser der verschiedenen Kanälchenabschnitte (und die Henlesche Schleife als Ganzes) sind nach Zufuhr hypertoner Mannit- und Saccharoselösung im Vergleich zu den Kontrollwerten bei Antidiurese jeweils wesentlich größer. Dieser Unterschied ist beim proximalen Tubulus, dessen Lumen bei Antidiurese auffallend eng erscheint, besonders deutlich (vgl. BRODIE u. MACKENZIE, BRUNNER u. Mitarb., BOHLE u. Mitarb.).

Tabelle 2

Art der Versuche <sup>1</sup>	Diurese ml/kg, min	Paraffinschnitte nach												Gefärbte Gefrierschnitte nach Einfrieren mit					
		Helly-Fixierung			Alkohol-Fixierung			Freeze-Substitution und Einfrieren mit						CO <sub>2</sub>		CO <sub>2</sub> -Aceton			
								CO <sub>2</sub> -Aceton			CO <sub>2</sub>								
		G	L	Fl	G	L	Fl	G	L	Fl	G	L	Fl	G	L	Fl	G	L	Fl
<i>Tubulus contortus I:</i>																			
A	48,0	6,2	1780											55,0	0	2360			
B	1,22	46,2	24,2	1230	43,0	21,8	1080	43,2	29,4	790	35,4	15,4	780	48,1	10,3	1740	53,6	10,9	2160
C	0,96	39,2	15,8	1010	41,6	17,6	1120	43,8	32,4	680	35,4	18,4	720	52,5	23,7	1725	58,2	13,8	2500
D	2,24	40,8	18,5	1040										49,8	4,7	1930			
														54,3	12,7	2200			
														54,8	0	2360			
<i>Pars recta:</i>																			
A	47,6	12,3	1660																
B	1,22	44,6	25,6	1060	50,8	30,6	1290	41,8	26,4	830	36,8	15,7	870						
C	0,96	47,2	23,8	1300	46,4	23,0	1280	54,4	42,4	910	40,4	24,4	820						
D	2,24	46,4	22,4	1300															
<i>Henlesche Schleife (Pars tenuis):</i>																			
A	15,3				19,5			20,8			15,6								
B	1,22	16,9			13,9			25,6			17,5								
C	0,96	14,1																	
D	2,24	15,7																	
<i>Tubulus contortus II:</i>																			
A	32,6	15,9	635											38,5	4,4	1135			
B	1,22	33,6	22,4	490	32,8	23,0	430	32,0	20,8	460	29,6	17,8	440	29,7	21,0	350	34,0	20,1	590
C	0,96	30,6	17,6	490	30,4	17,5	490	36,6	28,6	410	30,5	17,6	490	33,1	20,5	530	41,4	26,5	800
D	2,24	34,2	21,0	570										41,8	23,5	940			

<sup>1</sup> A = Sechs antidiuretische Kontrolltiere. B = Mannitinfusion, 15 %. C = Infusion von Tyrodelösung. D = Infusion von Tyrodelösung.

Tubulusdimensionen von 2,5—2,8 kg schweren Katzen bei verschiedener histologischer Aufarbeitung. G = Gesamtdurchmesser, L = Lumendurchmesser und Fl = Querschnittsfläche des Epithels.

A: Mittelwerte von sechs antidiuretischen Kontrollkatzen nach Helly-Fixierung und Einfrieren mit CO<sub>2</sub>-Aceton. B: 2,7 kg schwere Katze nach intravenöser Stoßinjektion von 1,5 g/kg Mannit in 5 %iger Lösung mit anschließender Infusion von 300 mg/kg/min Mannit in gleicher Lösung für 30 min bis zur Nierenentnahme. C und D: 2,5 kg schwere Katzen nach Tyrodeinfusion (33 ml/kg als intravenöse Stoßinjektion, anschließend für 30 min 6,5 ml/kg/min bis zur Nierenentnahme intravenös).

Bei B und C wurde die linke Niere nach der Hilusligatur in CO<sub>2</sub>-Aceton eingefroren, die rechte für Fixierung bzw. Einfrieren mit CO<sub>2</sub> in vier Blöcke aufgeteilt (zur Auswertung vgl. Tabelle 1). Für die Pars tenuis der Henleschen Schleife war nur der Gesamtdurchmesser bestimmbar. Die Doppelwerte bei den Gefrierschnitten entsprechen den im Text erwähnten regionalen Unterschieden.

Die Auswertung der *Auflichtphotogramme* am *Tubulus contortus I* ergibt, daß hypertonische Lösungen zwar auch *in vivo* zu einer Lumenerweiterung führen; die prozentuale Zunahme der proximalen Lumendurchmesser erscheint hier mit rund 50—60 % bei der Katze und 4,5 % bei kleinen bzw. 21,5 % bei großen Ratten aber wesentlich geringer als im histologischen Schnitt (bei den Katzen mindestens 200, bei kleinen Ratten mindestens 290 %; Tabelle 1, 3 und 4, Abb. 1

Tabelle 3

Art des Versuches	Antidiurese				Mannitdiurese			
	Anzahl der Tiere	Gesamt-durchmesser ( $\mu$ )	Lumen-durchmesser ( $\mu$ )	Quer-schnitts-fläche ( $\mu^2$ )	Anzahl der Tiere	Gesamt-durchmesser ( $\mu$ )	Lumen-durchmesser ( $\mu$ )	Quer-schnitts-fläche ( $\mu^2$ )
Auflicht <i>in vivo</i>	9	37,8 ± 1,8	16,4 ± 1,8	912 ± 31	5	39,2 ± 2,2	17,1 ± 1,5	970 ± 61
Auflicht nach Hilusdurchtrennung	6	33,4 ± 2,1	0	878 ± 47	5	38,4 ± 1,9	(15,6 ***)	(970 ± 61)
Gefrierschnitt nach Einfrieren mit CO <sub>2</sub> -Azeton	5	40,6 ± 0,74	0,5 ± 0,69	1275 ± 49	5	39,9 ± 0,8	11,7 ± 3,02	1140 ± 64
Paraffinschnitt nach Fixierung in Carnoy	8	35,8 ± 1,2	3,8 ± 0,2	1005 ± 66	8	39,8 ± 0,8	13,9 ± 0,8	1088 ± 47
Paraffinschnitt nach Fixierung in Helly	10	26,6 ± 3,9	2,3 ± 1,6	556 ± 12	5	26,7 ± 4,2	10,0 ± 2,8	480 ± 14

Mittelwerte und mittlere Fehler aus Messungen proximaler Tubuli von 70—80 g schweren Ratten im Auflicht und nach histologischer Aufarbeitung bei Antidiurese und osmotischer Diurese.

Es wurden mindestens je zehn Gesamt- und Lumendurchmesser bestimmt und daraus die Querschnittsfläche des Epithels berechnet. Bei osmotischer Diurese erfolgten die Messungen etwa 5 min nach intravenöser Stoßinjektion von 6,25 ml einer 30%igen Mannitlösung pro kg. Die *P*-Werte (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , keine Angaben =  $p > 0,05$ ) beziehen sich jeweils auf den Unterschied zwischen Antidiurese und Mannitdiurese.

Die auflichtmikroskopischen Werte nach Hilusdurchtrennung wurden mit Hilfe der Methylenblaufärbung *in vivo* gewonnen; die eingeklammerten Lumendurchmesser wurden unter der Annahme gleichbleibender Querschnittsflächen aus dem hier allein meßbaren Gesamtdurchmesser berechnet. Die Angaben für carnoy- und hellyfixierte Paraffinschnitte sind den Arbeiten von BRUNNER u. Mitarb. sowie SCHUBERT u. Mitarb. entnommen.

und 5)<sup>1</sup>. Gleichzeitig fällt auf, daß die Lumendurchmesser antidiuretischer Katzen und Ratten *in vivo* um Größenordnungen über jenen im Schnittpräparat liegen (Abb. 1—5). Erst Unterbrechung der Filtration durch Aortenabklemmung oder Hilusdurchtrennung führt unter dem Auflichtmikroskop innerhalb von 20 sec (bis 2 min) zu einer wesentlichen Verminderung oder zum Verschwinden der proximalen Tubuluslumina (Tabelle 4 bzw. 1 und 3, Abb. 1—4). Im Gegensatz zur Antidiurese kommt es bei osmotischer Diurese durch die Aortenabklemmung oder Hilusdurchtrennung nur zu einer Abnahme des Lumendurchmessers um 17—30 bzw. 8,7 und 14,8% (Tabelle 1, 3 und 4). Die histologische Darstellung der proximalen Tubulusdimensionen geht demnach bei Antidiurese irreführenderweise vom Zustand postmortal „kollabierter“ Tubuli aus und gibt die relative Lumenerweiterung bei Infusion hypertoner Lösungen — auf Grund der hier

<sup>1</sup> Die allgemein geübte und hier zum Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren beibehaltene Angabe der Lumenerweiterung in Prozenten des Kontrollwerts bei Antidiurese ist nicht sehr glücklich, da dieser Kontrollwert bei der histologischen Darstellung gegen 0 konvergiert.

wesentlich geringeren postmortalen Abnahme des Lumendurchmessers — in der Richtung zwar unverfälscht, jedoch stark übertrieben wieder (Abb. 7). Detaillierter Vergleich der histologischen Daten ergibt, daß sekundäre — für Antidiurese und osmotische Diurese häufig verschiedene — Fehler infolge spezieller histologischer Prozeduren zu den vorangehenden postmortalen Veränderungen der

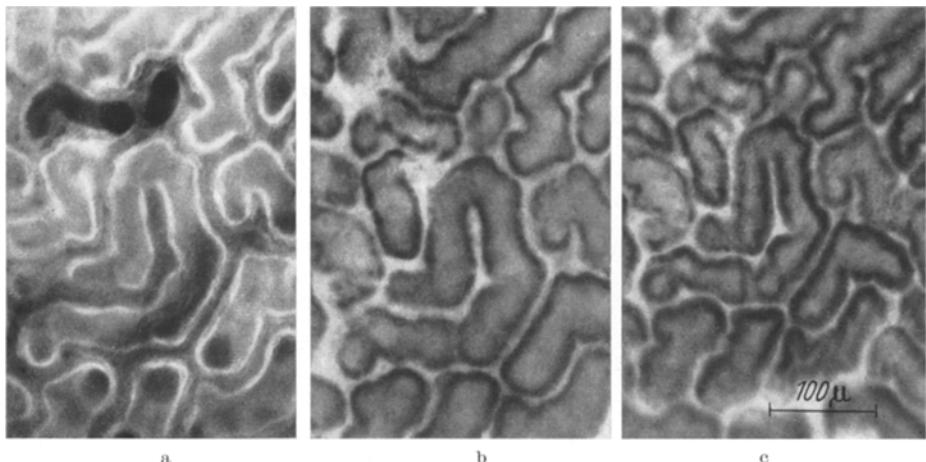


Abb. 3a—c. Auflicht-Mikrophotogramme der Nierenoberfläche einer 320 g schweren, männlichen Ratte bei Antidiurese. In Abb. 3a ist nach Lissamin-Stoßinjektion das Lumen eines distalen Tubulus dunkel gefärbt. Abb. 3b zeigt die gleiche Stelle nach Methylenblaufärbung *in vivo*, Abb. 3c 6 min nach Hilusdurchtrennung

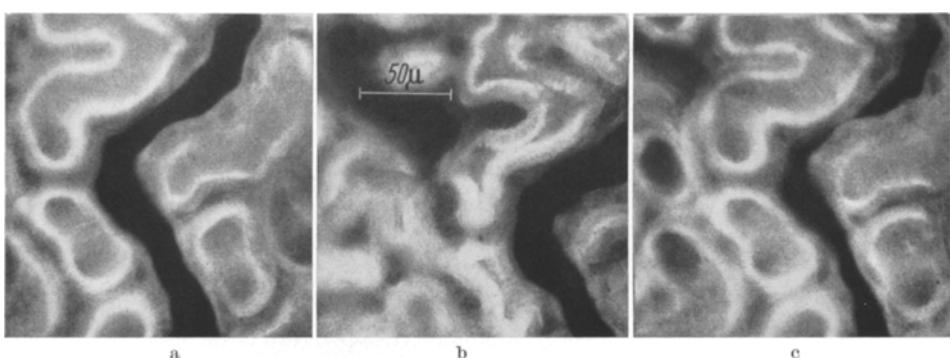


Abb. 4a—c. Wiederholung des Versuchs in Abb. 2 bei stärkerer Vergrößerung. a Erneute Lissamin-Darstellung eines distalen Tubulus. b Zustand 40 sec nach Aortenabklemmung. c Partielle Kompression des distalen Tubulus 2,5 min nach Wiedereröffnung der insgesamt 4 min geschlossenen Aortenklemme

Lumenweite hinzukommen. Es wird später zu besprechen sein, ob die auflichtmikroskopischen Ergebnisse nach Aortenabklemmung oder Hilusdurchtrennung im Einzelfall zur quantitativen Bestimmung dieser histologisch-artefiziellen Abweichungen dienen können.

Übersichtshalber wurden die Lumendurchmesser der gewundenen Hauptstücke im Auflicht auch bei größeren Kontrollratten bis zu 410 g ermittelt. Nach Abb. 8 nehmen die Lumendurchmesser mit dem Körpergewicht von 15 auf Werte von rund 20  $\mu$  zu.

Im Gegensatz zum *Tubulus contortus I* führen hypertonische Lösungen *in vivo* am *Tubulus contortus II* der Ratte zu beträchtlichen Lumenerweiterungen um

rund 70% (vgl. Tabelle 4 und Abb. 5 sowie GOTTSCHALK u. MYLLE sowie THURAU u. DEETJEN). Weiterhin nehmen die distalen Tubuluslumina bei osmotischer Diurese *und* Antidiurese infolge Aortenabklemmung nur wenig ab (Abb. 2 und 4).

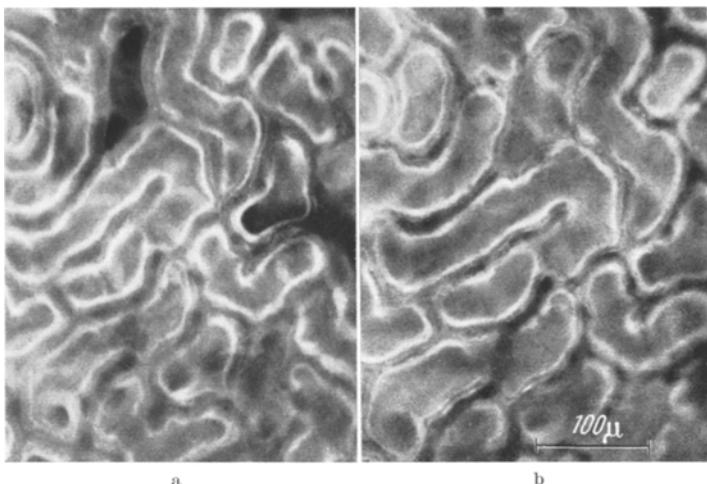


Abb. 5a u. b. Mikrophotogramme der Nierenoberfläche einer 320 g schweren, männlichen Ratte *in vivo*. a Lissamindarstellung distaler Tubuli bei Antidiurese. b Gleiche Stelle 7 min nach intravenöser Stoßinjektion von 6,25 ml 30 %iger Mannitlösung/kg

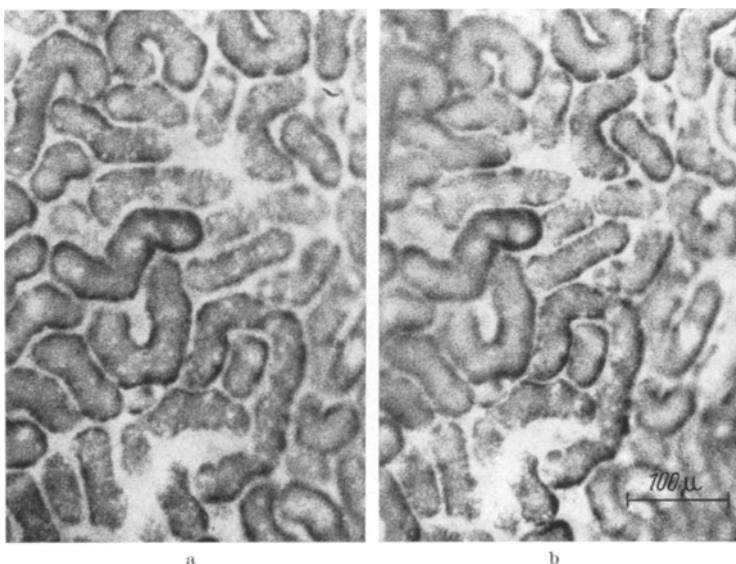


Abb. 6a u. b. Mikrophotogramme der mit Methylenblau lokal angefärbten Nierenoberfläche einer 75 g schweren Ratte bei osmotischer Diurese. a *In vivo*, 10 min nach intravenöser Stoßinjektion von 6,25 ml einer 30 %igen Mannitlösung/kg. b Gleiche Stelle, 2,5 min nach Hilusdurchtrennung

Im Gegensatz zum proximalen Tubuluslumen geht demnach die übliche histologische Darstellung der distalen Lumina auch bei Antidiurese von Werten aus, die sich von jenen *in vivo* nicht wesentlich unterscheiden.

Tabelle 4

Art des Versuches	Proximale Tubuli				Distale Tubuli				
	Anzahl der Tiere	Gesamt-durchmesser ( $\mu$ )	Lumen-durchmesser ( $\mu$ )	Quer-schnittsfläche ( $\mu^2$ )	Anzahl der Tiere	Anzahl der gemessenen Tubuli	Gesamt-durchmesser ( $\mu$ )	Lumen-durchmesser ( $\mu$ )	Quer-schnittsfläche ( $\mu^2$ )
<i>Antidiurese:</i>									
Vor Aorten-abklemmung	24	48,5 $\pm 0,63$	22,8 $\pm 0,66$	1439 $\pm 44,2$	8	14	42,7 $\pm 1,67$	18,1 $\pm 1,31$	1171 $\pm 90$
$\Delta$ % nach Aorten-abklemmung	8	-12,5% $\pm 1,28$	-75,2% $\pm 1,18$	-2,5% $\pm 2,11$	5	10	+2,2% $\pm 1,4$	+0,8% $\pm 4,15$	+4,5% $\pm 3,05$
<i>Mannitdiurese:</i>									
Vor Aorten-abklemmung	8	52,8 $\pm 0,68$	27,7 $\pm 0,55$	1585 $\pm 44$	4	4	53,1 $\pm 1,38$	30,4 $\pm 1,71$	1498 $\pm 178$
$\Delta$ % nach Aorten-abklemmung	2	-1,9% $\pm 14,8\%$	-14,8% $\pm 2,5\%$	+2,5% $\pm 2,1$	2	2	-2,7% $\pm 1,4$	-3,9% $\pm 4,15$	-4,3% $\pm 3,05$

Mittelwerte und mittlere Fehler proximaler und distaler Tubuli von 300—330 g schweren männlichen Ratten *in vivo* unter Antidiurese und osmotischer Diurese sowie nach Aortenabklemmung.

Es wurden mindestens zehn proximale Gesamt- und Lumendurchmesser pro Tier gemittelt und daraus die Querschnittsfläche des Epithels berechnet. Die geringere Anzahl der Bestimmungen an distalen Tubuli ist gesondert angegeben. Die osmotische Diurese wurde durch intravenöse Stoßinjektion von 6,25 ml 30%iger Mannitlösung/kg erzeugt. Die Werte vor Aortenabklemmung fanden sich 2—5 min nach dem Mannitstoß.

Für den Zustand bei Aortenabklemmung sind nur die Mittelwerte aus den individuellen prozentualen Abweichungen vom unmittelbar vorhergehenden Kontrollwert angegeben, und zwar für Antidiurese an sechs Ratten 2 min nach Beginn der Aortenabklemmung und an je einem Tier nach 3 bzw. 5,5 min. Die Werte blieben von der 2. min an stabil. Bei osmotischer Diurese erfolgte die Aortenabklemmung 5 min nach dem Mannitstoß und dauerte 2 min. Da die Tubulusdimensionen an der ausgebluteten Niere bei osmotischer Diurese nicht bestimmt werden konnten, mußten hier die Aufnahmen 30 bzw. 50 sec nach Wiedereröffnung der Aorta gewonnen werden.

Erst nach Wiedereröffnung der Aortenklemme, d. h. bei wiederkehrender Filtration und erneuter Erweiterung proximaler Tibulu kam es bei Antidiurese zum distalen „Tubulkollaps“ (Abb. 4, s. Besprechung der Versuchsergebnisse). 5—10 min nach Beseitigung der Aortenklemme war das distale Tubuluslumen wieder in seiner ursprünglichen Form zu erkennen.

Unter später anzuführenden Vorbehalten kann durch indirekten Vergleich mit dem auflichtmikroskopischen Ergebnis an großen Ratten abgeschätzt werden, mit welcher Genauigkeit die einzelnen histologischen Verfahren die distale Lumenerweiterung bei osmotischer Diurese wiedergeben (Tabelle 5).

Laut Tabelle 1 stellen sich die Tubuluslumina im histologischen Schnitt auch nach Infusion kleiner Mengen *isotonischer Mannit- und Kochsalzlösung* weiter dar als beim Kontrolltier. Dieser Effekt ist durch Infusion größerer Mengen *isotonischer Mannit- und Tyrodelösung* regelmäßiger und deutlicher zu erzielen (Tabelle 2). Wie schon bei Infusion hypertoner Lösungen erscheint die prozentuale Zunahme des proximalen Lumendurchmessers bei Tyrodeinfusion *in vivo* geringer als im histologischen Schnitt. Aortenabklemmung oder Hilusdurch-

trennung vor und nach Tyrodeinfusion decken auf, daß diese Diskrepanz auch hier auf den wesentlich stärkeren postmortalen „Tubulkollaps“ bei Antidiurese zurückzuführen ist (Tabelle 6).

Zur Erklärung der „postmortalen“ Veränderungen wurde die nach Aortenabklemmung ausgeschiedene Urinmenge bestimmt. Vor der Abklemmung betrug die Diurese einer Niere bei fünf Kontrollratten von 310—350 g 1,8—5  $\mu$  l/min, bei Tyrodeinfusion 12—65  $\mu$ l/min und bei fünf Ratten mit Mannitdiurese 30—60  $\mu$ l/min. Nach Schluß der Aortenklemme wurden nur bei zwei Kontrollratten in 30 bzw. 90 sec noch insgesamt 0,5 bzw. 1,6  $\mu$ l Urin ausgeschieden; bei Tyrodeinfusion betrug dieser Wert rund 2  $\mu$ l, bei Mannitdiurese an zwei Tieren 6,5

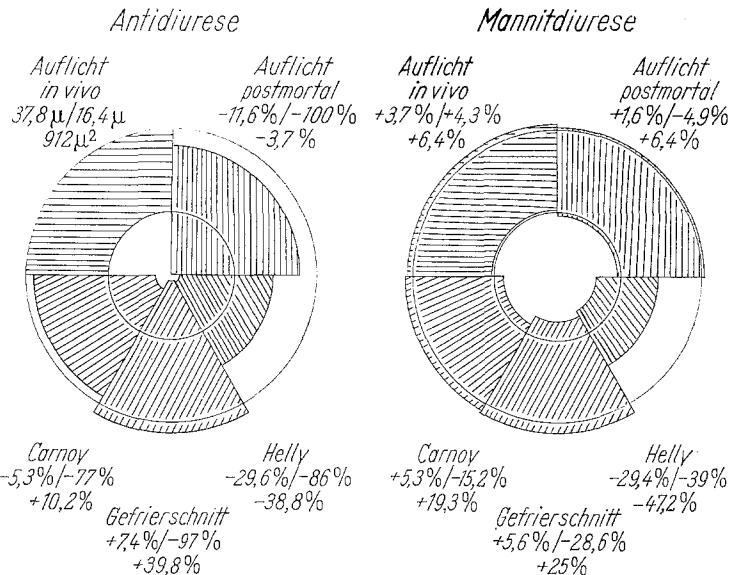


Abb. 7. Schematische Darstellung proximaler Tubulusquerschnitte von 70—80 g schweren Ratten (vgl. Tabelle 3). Links: antidiuretische Kontrollratten; rechts: 5 min nach intravenöser Stoßinjektion von 6,25 ml 30 %iger Mannitlösung/kg. Obere Halbkreise: Auflichtmikroskopische Ergebnisse, links jeweils *in vivo*, rechts 5 min nach Hilusdurchtrennung. Untere Halbkreise: histologische Ergebnisse (Paraffinschnitte nach Carnoy- bzw. Helly-Fixierung sowie Gefrierschnitte nach Einfrieren mit  $\text{CO}_2$ -Aceton). Die beigefügten Zahlen geben für Gesamtdurchmesser, Lumendurchmesser und Querschnittsflächen jeweils die prozentuale Abweichung vom Kontrollwert bei Antidiurese *in vivo* wieder.

bei den übrigen 21, 5, 27 und 36  $\mu$ l. Bei zwei Kontrollkatzen lieferte eine Niere nach Aortenabklemmung noch rund 10  $\mu$ l, bei einer Katze mit Mannitdiurese innerhalb 5 min noch 150  $\mu$ l Urin.

Die Wirkung osmotischer Diuretica auf die übrigen Tubulusdimensionen ist — im Gegensatz zum Tubuluslumen — oft nicht mit ausreichender Genauigkeit zu ermitteln. Der Gesamtdurchmesser  $D_g$  variiert im Rahmen der anzutreffenden Relationen Gesamt-/Lumendurchmesser bei reiner oder vorwiegender Querdrehung der Tubuli aus geometrischen Gründen wesentlich weniger als der Lumendurchmesser  $D_g$ , so daß selbst gleiche Meßfehler für Lumen- und Gesamtdurchmesser, wie etwa im histologischen Schnitt, bei der Beurteilung des Gesamtdurchmessers unter verschiedenen Diuresezuständen entsprechend schwerer ins Gewicht fallen. Bei der auflichtmikroskopischen Bestimmung des Gesamtdurchmessers (wie allgemein der äußeren Tubuluskonturen und entsprechend auch von Längenänderungen bestimmter Tubulusabschnitte) kommen, wie später

näher auszuführen, u. U. noch spezifische Fehlerquellen hinzu. Da der Gesamtdurchmesser nach

$$D_g = \sqrt{\frac{4F}{\pi} + D_l^2}$$

die Querschnittsfläche des Epithels  $F$  bei der vorgegebenen Relation  $D_g/Dl \gg 1$  maßgeblich bestimmt, gelten die gleichen Einschränkungen auch für die Querschnittsfläche des Tubulusepithels und rechtfertigen für diese und den Gesamtdurchmesser vorerst nur eine summarische Darstellung.

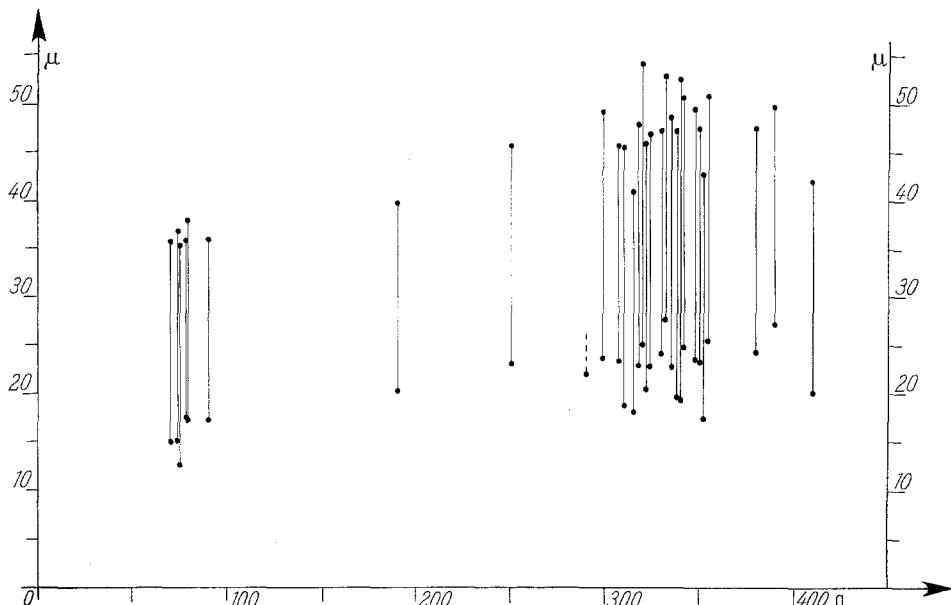


Abb. 8. Beziehung zwischen Tergewicht und proximalen Tubulusdimensionen bei antidiuretischen Kontrollratten *in vivo*. Obere Punkte: Gesamtdurchmesser; untere Punkte: Lumendurchmesser; Verbindungsline: doppelte Wandstärke aus jeweils mindestens 10 Auflichtmessungen pro Tier. Abszisse: Tergewicht in Gramm; Ordinate: Durchmesser in  $\mu$

Tabelle 5

	Ratten		Katzen						
	Auflicht, Mannit <i>in vivo</i>	Paraffinschnitt		Paraffinschnitt Helly		Gefrierschnitt nativ		Gefrierschnitt gefärbt	
		Carnoy Mannit	Helly Mannit	Mannit	Saccharo- se	Mannit	Saccharo- se	Mannit	Saccharo- se
Gesamtdurchmesser	+24,3 %	+5,1 %	+14,4 %	+2,1 %	-1,5 %	+17,3 %	+20,3 %	+25,1 %	+19,5 %
Lumenthickheit	+68,0 %	+49,5 %	+162 %	+31,5 %	+29,5 %	+20,1 %	+42,2 %	+49,8 %	+59,6 %
Querschnittsfläche	+27,4 %	+2,5 %	-11,9 %	-18,1 %	-25,0 %	+34,7 %	± 0	+12,8 %	-18,5 %

Mittlere prozentuale Änderung distaler Tubulusdimensionen unter osmotischer Diurese im Verhältnis zur antidiuretischen Kontrolle (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ; keine Angaben =  $p > 0,05$ ).

Die Auflichtwerte sind der Tabelle 4, die Paraffinschnitt-Werte nach Carnoy- bzw. Helly-Fixierung an Ratten den Arbeiten von BRUNNER u. Mitarb. bzw. SCHUBERT u. Mitarb. entnommen; die Ergebnisse an Katzen entstammen Tabelle I.

Die Mannitgaben/kg Körpergewicht an Ratten und Katzen sind verschieden (vgl. Legende Tabelle 4 und 1).

Nach den *auflichtmikroskopischen* Ergebnissen nehmen bei Mannit- und Tyrodeinfusion neben den Lumina regelmäßig auch die *Gesamtdurchmesser* zu (Abb. 1 und 5). Diese Vergrößerung der Gesamtdurchmesser ist im Verhältnis zur gleichzeitigen Lumenerweiterung stärker, als bei einfacher Querdehnung der Tubuli zu erwarten wäre, so daß bei Mannit- und Tyrodeinfusion auch die *Querschnittsfläche* des Epithels proximal und besonders deutlich distal zunimmt (Tabelle 1, 4 und 6).

An Hand charakteristischer Stellen der Zirkumferenz gestreckt verlaufender Kanälchen wurde nach Mannitinfusion an 32 proximalen und fünf distalen Tubuli 310—330 g schwerer Ratten außerdem eine mittlere Längenzunahme um 7,6 bzw. 12,9 % gemessen. Berücksichtigt man die jeweilige Vergrößerung der Querschnittsfläche in Tabelle 4, so würde sich aus diesen Längenänderungen eine Zunahme des proximalen Epithelvolumens um rund 18 % und des distalen Epithelvolumens um rund 42 % errechnen. Nach 25 min Tyrodeinfusion betrug die Zunahme der Querschnittsfläche am proximalen Tubulus zweier Ratten 8 und 26 %, die Längenzunahme 8 und 10 %, die daraus errechnete Vergrößerung des Epithelvolumens 20 bzw. 40 % (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6

Zeit (min)	Gekürztes Versuchs- protokoll	Diurese einer Niere ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	Gesamt- durchmesser ( $\mu$ )	Lumen- durchmesser ( $\mu$ )	Quer- schnitts- fläche ( $\mu^2$ )	Tubuluslänge in % (Antidiurese $= 100 \%$ )
0	Kontrollwert bei Anti- diurese . . . . .	7	52,9	27,8	1590	100
2	3 min Aortenabklem- mung <sup>1</sup> . . . . .		45,9	9,9	1580	92,8
29	Beginn der Tyrode- infusion . . . . .					
34		12	54,4	32,0	1520	104,3
36,5	2,5 min Aorten- abklemmung . . .		54,0	23,1	1870	102,7
38,5	4 min Aorten- abklemmung <sup>1</sup> . . .		54,7	23,8	1905	102,9
54		65	57,6	33,3	1730	108,1
56	2 min Aorten- abklemmung . . .		55,0	28,0	1755	104,6
58,5	4,5 min Aorten- abklemmung <sup>1</sup> . . .		56,2	25,0	1980	103,4
65		700	59,2	36,5	1690	102,8
77		500	60,3 <sup>2</sup>	38,8	1690	102,5 <sup>3</sup>
78	Ende der Tyrode- infusion, Hilus- durchtrennung					
94			53,0 <sup>2</sup>	(25,6)	(1690)	92,2 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Nach der Aufnahme jeweils Wiederöffnung der Aortenklemme.

<sup>2</sup> Nach Methylenblaufärbung *in vivo* gewonnen.

<sup>3</sup> Mittelwert aus jeweils nur drei Messungen.

Auflichtmikroskopische Mittelwerte der gleichen zehn proximalen Tubuli vor und bei Tyrodeinfusion; Ratte, 330 g. Neben Gesamt- und Lumendurchmesser wurde die prozentuale Längenänderung gestreckt verlaufender Tubulusabschnitte gemessen und die Querschnittsfläche des Epithels berechnet. Die Mikrophotogramme erfolgten bei Aortenabklemmung jeweils am Ende der angegebenen Versuchsperioden. Die intravenöse Tyrodeinfusion lief nach einem Stoß von 33 ml/kg pro min mit einer Geschwindigkeit von 6,5 ml/kg/min bis zur Hilusdurch-

trennung. Der eingeklammerte Lumendurchmesser wurde unter Annahme gleichbleibender Querschnittsflächen aus dem Gesamtdurchmesser berechnet.

Im *histologischen Schnitt* erscheinen die proximalen und distalen *Gesamtdurchmesser* nach Infusion hypertoner und isotonischer Lösungen im Gegensatz zu den Lumina nicht regelmäßig erweitert; bei Helly-Fixierung kommen sogar Abnahmen des Gesamtdurchmessers vor. Die *Querschnittsfläche* stellt sich im Schnittpräparat bei der osmotischer und Tyrode-Diurese — im Gegensatz zum auflichtmikroskopischen Ergebnis — meist und vor allem bei Helly-Fixierung kleiner dar als beim Kontrolltier und ist nur an Gefrierschnitten sowie bei Carnoy-Fixierung gelegentlich vergrößert (Tabelle 1, 2 und 3).

Tabelle 7

Art des Versuches	Auflicht <i>in vivo</i>			Auflicht nach 2 min Aortenabklemmung bzw. nach 5 min Hilusdurchtrennung			Schnittpräparat im Phasenkontrast nach Osmiumfixierung		
	Gesamt-durchmesser ( $\mu$ )	Lumendurchmesser ( $\mu$ )	Querschn.-Fläche ( $\mu^2$ )	Gesamt-durchmesser ( $\mu$ )	Lumendurchmesser ( $\mu$ )	Querschn.-Fläche ( $\mu^2$ )	Gesamt-durchmesser ( $\mu$ )	Lumendurchmesser ( $\mu$ )	Querschn.-Fläche ( $\mu^2$ )
	( $\mu$ )	( $\mu$ )	( $\mu^2$ )	( $\mu$ )	( $\mu$ )	( $\mu^2$ )	( $\mu$ )	( $\mu$ )	( $\mu^2$ )
a) Antidiuretisches Kontrolltier . . . . .	42,8	17,4	1200	—/—	—/—	—/—	45,3	18,3	1350
b) Antidiuretisches Kontrolltier mit Aortenabklemmung . . . . .	45,6	18,8	1360	37,4	0	1100	39,8	0	1240
c) Antidiuretisches Kontrolltier mit Hilusdurchtrennung . . . .	46,7	24,9	1235	39,4	0	1210	41,8	0	1370
d) Mannitdiurese . . . . .	55,2	32,1	1590	—/—	—/—	—/—	46,0	28,9	1015
e) Mannitdiurese mit Hilusdurchtrennung . . . . .	55,8	29,5	1770	—/— <sup>1</sup>	24,9	—/— <sup>1</sup>	44,1	22,7	1125

<sup>1</sup> Siehe Legende.

Proximale Tubulusdimensionen von fünf 310—350 g schweren männlichen Ratten im Auflichtmikroskop und im Schnittpräparat nach Osmiumfixierung.

Die Fixierlösung (Caulfield-Puffer) wurde lokal im Anschluß an die letzte Mikrophotographie, also bei a, b und d bereits *in vivo* aufgebracht. Für die (phasenkontrastmikroskopische) Untersuchung wurde nur der innerhalb 10 min von der Nierenoberfläche aus anfixierte Bezirk der Nierenrinde von 2—3 mm Tiefe herausgeschnitten, durchfixiert, in Araldit eingebettet und geschnitten. Es wurden jeweils mindestens zehn Gesamt- sowie Lumendurchmesser bestimmt und gemittelt, daraus die Querschnittsfläche des Epithels berechnet.

Die Tiere d und e erhielten dreimal je 6,25 ml 30%iger Mannitlösung/kg als intravenöse Stoßinjektion im Abstand von jeweils 5 min. Die Aufnahmen erfolgten 5 min nach dem letzten Mannitstoß, bei e wurde anschließend sofort der Hilus durchtrennt; der Gesamtdurchmesser war hier nicht bestimmbar (s. Methodik).

Die Unsicherheit der routinemäßigen histologischen Darstellung geht auch für Gesamtdurchmesser und Querschnittsfläche aus dem Vergleich der histologischen Ergebnisse untereinander hervor. Wie beim Lumendurchmesser müßten zur Abschätzung der gemeinsamen „postmortalen“ und jeweils spezifischen, histologischen Artefakte auch hinsichtlich dieser Tubulusdimensionen die auflichtmikroskopischen Werte nach Hilusdurchtrennung oder Aortenabklemmung herangezogen werden. Die auflichtmikroskopische Bestimmung der Gesamtdurchmesser an der entbluteten Niere ist jedoch mit einer zusätzlichen Verschlechte-

rung der optischen Verhältnisse infolge Kontrastabnahme belastet. Dies mindert — zusammen mit den oben erwähnten Fehlerquellen — den Wert einer eingehenden Kritik der histologischen Ergebnisse. Allgemein dürfte gelten, daß die angeführten Diskrepanzen zwischen der auflichtmikroskopischen und histologischen Beurteilung des Effekts osmotischer Diuretica an Gesamtdurchmesser und Querschnittsfläche — infolge geringer „postmortaler“ Veränderungen der Querschnittsfläche — sich auch bei Berücksichtigung der auflichtmikroskopischen Werte nach Aortenabklemmung ergeben und demnach durch histologische Artefakte bedingt sind. Lediglich bei der Katze nimmt die bei Mannitinjektion unter dem Auflichtmikroskop vergrößert erscheinende proximale Querschnittsfläche „postmortal“ wieder auf den Wert bei Antidiurese ab, so daß hier das histologische Ergebnis besser mit dem auflichtmikroskopischen nach Aortenabklemmung übereinstimmt (Tabelle 1, 3 und 4).

Die Länge der distalen Tubuli nahm an sechs Kontrollratten von Tabelle 4 und zwei Ratten mit osmotischer Diurese „postmortal“ nur um 1,2 bzw. 0,7 % ab. Am proximalen Tubulus führte Hilusdurchtrennung oder Aortenabklemmung bei Kontrolltieren zu einer Längenabnahme um 4,7 % (32 Tubuli), bei osmostischer Diurese um 3,1 % und bei Tyrodeinfusion um 5—6 % (sechs Tubuli).

## Diskussion

### Zur Kritik der Methoden

Die mit Hilfe verschiedener histologischer Methoden bestimmten Tubulusdimensionen weichen in der Regel deutlich voneinander ab. Daraus ergibt sich vor allem für die aus geometrischen Gründen stärker variierenden Tubuluslumina eindeutig, daß im Höchstfall ein Verfahren die tatsächlichen Werte wiedergibt. Von anderer Seite war angenommen worden, daß diese methodischen Fehler bei Antidiurese und osmotischer Diurese jeweils gleich, die morphologischen Auswirkungen osmotischer Diuretica daher auch mit konventionellen Verfahren zuverlässig zu ermitteln seien. Würde diese Annahme zutreffen, so müßten die prozentualen Veränderungen der Tubulusdimensionen bei Mannit- oder Saccharosegabe unabhängig von der verwendeten Methode übereinstimmen. Dies ist laut Tabelle 5 am Tubulus contortus II aber keineswegs der Fall; am Tubulus contortus I werden die — durchaus ähnlichen — spezifisch-histologischen Artefakte allerdings durch eine zweite, größere Fehlerquelle, den postmortalen proximalen „Lumenkollaps“ überspielt, so daß hier alle histologischen Verfahren im Prinzip zum gleichen Ergebnis einer übertrieben dargestellten Lumenerweiterung bei Mannitgabe führen. Am distalen Tubulus dagegen stehen beim Vergleich von Nieren im Zustand der Antidiurese und osmotischen Diurese die spezifisch-histologischen Artefakte infolge wesentlich geringerer postmortaler Veränderung stärker im Vordergrund (vgl. dagegen HANSSEN).

Ursprünglich bestand die Absicht, genaue Fehlerbreiten einzelner histologischer Methoden an Hand der Auflichtmikroskopie zu ermitteln. Diese sollten sich — unter Berücksichtigung der postmortalen Veränderungen — jeweils aus dem Vergleich Histologie: Auflichtmikroskopie nach Hilusdurchtrennung oder Aortenabklemmung ergeben. Folgende Gründe sprechen gegen dieses Vorhaben:

1. Im histologischen Schnitt wurden allgemein *tiefer gelegene* im Auflicht naturgemäß ausschließlich *subkapsuläre Abschnitte von Tubuli contorti I und II* berücksichtigt. Es läßt sich mit den hier verwendeten Methoden aber nicht entscheiden, ob die Dimensionen von Tubuli contorti I und II in beiden Regionen identisch sind.

Auffallende Unterschiede zwischen den Dimensionen subkapsulärer und tiefer gelegener Tubuli sind weder in Paraffin- noch in Gefrierschnitten zu erkennen, es sei denn, die postmortalen Veränderungen würden bei letzteren in der Tiefe des Gewebes mit allzu großer Verzögerung unterdrückt (vgl. HANSEN). Im Gefrierschnitt behindert neben der verschiedenen Einfriergeschwindigkeit<sup>1</sup> die „Randschädigung“ infolge Austrocknung den stichhaltigen Vergleich; Fixierartefakte wieder können sich durch die fortschreitende Verdünnung des Fixiermittels im Gewebe verschieden auswirken<sup>2</sup>.

Ähnliches gilt auch für die Osmium-Fixierung *in vivo* (vgl. PEASE). Diese bietet im Gegensatz zur üblichen Fixierung nach Nierenentnahme immerhin die Möglichkeit, proximale Lumendurchmesser auch am antidiuretischen Tier größenumordnungsmäßig richtig darzustellen (Tabelle 7, Abb. 9). Leider waren auch hier die optischen Verhältnisse nicht ausreichend, um die Herstellung der Schnitte über alle Stufen auflichtmikroskopisch zu kontrollieren (s. Legende). Im Hinblick auf die Funktion subkapsulärer Tubuli ist bemerkenswert, daß der interstitielle Raum auch nach Dekapsulation durch Reste fest adhärierender Kapsellamellen nach außen noch abgeschlossen erscheint (Abb. 9).

**2. Die Frage nach der Zuverlässigkeit der auflichtmikroskopischen Bestimmung von Tubulusdimensionen** ist unseres Erachtens für das *Tubuluslumen* mit ausreichender Genauigkeit zu beantworten.

Das proximale Tubuluslumen wird im Auflicht durch helle Streifen begrenzt, die mit dem stärker reflektierenden Bürstensaum identisch sein dürften. Mikropunktion mit anschließender Darstellung des Lumens durch öl- oder wassergelöste Farbstoffe sowie intravenöse Farbstoffinjektionen ergaben dementsprechend Lumendurchmesser, die dem vorher gemessenen Abstand der hellen Säume entsprachen. Weiterhin stimmte die Breite der reflektierenden Streifen mit der elektronenoptisch bestimmten Dicke des Bürstensaumes von 3,0—3,5  $\mu$  an 350 g schweren Ratten überein.

Nimmt der proximale Gesamtdurchmesser bei Unterbrechung der Filtration infolge Aortenabklemmung beim antidiuretischen Tier innerhalb von 20 sec (bis 2 min) um rund 15% ab, so verschwinden die hellen Säume („Tubulkollaps“). Da sich dabei die Querschnittsfläche des Lumens — unter Annahme unveränderter Querschnittsflächen des Epithels — zum Wert 0 berechnet, scheint es sich um eine Desorientierung der sich berührenden bzw. ineinanderfaltenden Bürstensäume zu handeln<sup>3</sup>. Daß es sich dabei nicht etwa um Folgen der Anoxybiose handelt, geht aus dem Verhalten bei Aortenabklemmung nach Mannit- und Tyrodegaben sowie daraus hervor, daß die hellen Säume postmortal kollabierter Tubuli bei künstlicher Wiedereröffnung der Lumina durch intratubuläre Mikroinjektion wieder erscheinen. Zum Teil kann man bei Aortenabklemmung sehen, wie die hellen Streifen zur Mitte des Lumens hin zusammenrücken, und fast verdämmern. Charakteristisch ist,

<sup>1</sup> Die regionalen Unterschiede der Tubulusdimensionen in Tabelle 1 und 2 z. B. könnten die Folge verschiedener Einfriergeschwindigkeit sein. Bei den Gefrierschnitten kommen zur Ausdehnung des Gewebes beim Einfrieren — bei der Katze rund 5% — offensichtlich noch weitere Fehlerquellen hinzu, die durch Kontrolle der einzelnen Arbeitsgänge erst auszuschließen wären. So ist die proximale Querschnittsfläche hier (mit Ausnahme der „nativen“ Gefrierschnitte bei osmotischer Diurese) um rund 45% größer als unter dem Auflichtmikroskop.

<sup>2</sup> Stichproben ergaben an drei Katzen mit osmotischer Diurese nach Helly-Fixierung im Vergleich zu tiefer gelegenen Tubuli subkapsulär 4—10% kleinere, bei zwei antidiuretischen Katzen nicht deutlich verschiedene proximale Gesamt- und Lumendurchmesser.

An zwei excidierten Rattennieren wurde versucht, die Gewebsschrumpfung während der Helly-Fixierung auflichtmikroskopisch zu verfolgen. Die Länge subkapsulärer, postmortal kollabierter proximaler Tubuli nahm innerhalb von 2—3 Std in Helly-Lösung um 3,7 bzw. 8,4%, der Gesamtdurchmesser um 10,7 bzw. 6,5% ab (vgl. Tabelle 3, aus der sich bei routine-mäßiger Fixierung für tiefer gelegene Konvolute kleinere Abmessungen oder stärkere Schrumpfungen ergeben würden). Die optischen Verhältnisse waren jedoch trotz vorhergehender Methylenblaufärbung nicht befriedigend.

<sup>3</sup> Das Verschwinden des Bürstensaumreflexes ist daher in den Tabellen — nicht ohne Willkür — mit einem Verstreichen des Tubuluslumens gleichgesetzt worden. Vgl. dagegen PARKER, SWANN u. SINCLAIR.

daß die Lumina innerhalb der angegebenen Zeit nach einer bestimmten Reihenfolge verschwinden, und zwar in den glomerulumnahen Schlingen offensichtlich zuletzt, und nach Entfernung der Aortenklemme innerhalb von  $\frac{1}{2}$ —3 min in umgekehrter Reihenfolge wieder erscheinen (Abb. 2).

Beim distalen Tubulus sind die Verhältnisse bis auf den „Tubuluskollaps“ ähnlich, doch erscheinen hier die seitlichen Begrenzungen des Lumens — d. h. wahrscheinlich der wesentlich dünneren Bürstensaum — schmäler und weniger hell. Es ist daher häufiger erforderlich, den distalen Lumendurchmesser durch Farbstoffinjektion darzustellen.

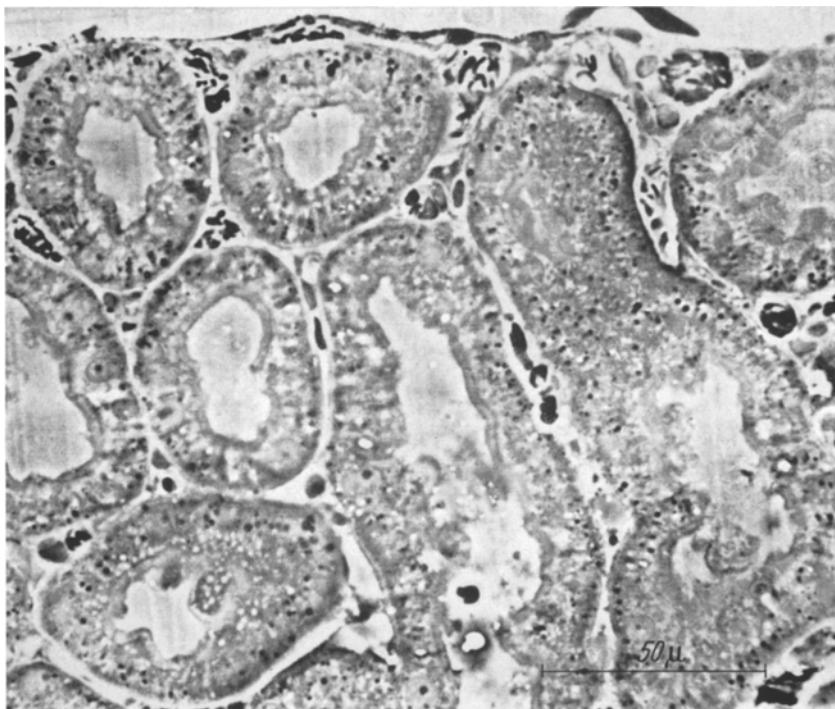


Abb. 9. Phasenkontrastaufnahme der Cortex corticis einer antidiuretischen Ratte nach Osmiumfixierung *in vivo* (vgl. Legende Tabelle 7). An der Nierenoberfläche sind (trotz Dekapsulation vor der Fixierung) noch Kapsellamellen zu erkennen

Der senkrecht zur Blickrichtung stehende Abstand zwischen den Lichtreflexen des Bürstensaumes kann demnach unseres Erachtens normalerweise mit ausreichender Genauigkeit gemessen und zuverlässig als „Lumendurchmesser“ identifiziert werden.

Dagegen läßt sich die geometrische Form des Lumenquerschnitts bei parallel zur Nierenkapsel verlaufenden Tubuli auflichtmikroskopisch nicht sicher ermitteln. Die unserer Berechnung von Querschnittsflächen des Epithels zugrunde gelegte Annahme kreisrunder Lumina z. B. ist — vor allem bei weitgehend „kollabierten“ Lumen — keineswegs bewiesen. Die proximalen Bürstensaumreflexe verlaufen zwar meist annähernd parallel, doch sind z. B. ovale (und vielleicht systematisch gerichtete) Lumina nicht auszuschließen (vgl. Änderungen der Querschnittsfläche bei osmotischer Diurese). Beim distalen Tubulus sind häufig deutliche Abweichungen vom parallelen Verlauf der seitlichen Lumenbegrenzung zu beobachten.

Die auflichtmikroskopische Bestimmung des *Gesamtdurchmessers* und damit auch der *Querschnittsfläche* ist weniger zuverlässig.

Bei der Katze liegen einzelne Kanälchen über großen subkapsulären Gefäßen und heben sich auch in der Außenkontur scharf ab. Bei der Ratte konnte die Möglichkeit, daß die

zwischen subkapsulären Tubuli liegenden, dunkleren Capillaren einen Teil der äußeren Tubuluskontur verdecken, weder durch intravitale Methylenblaufärbung noch durch Bestimmung der doppelten Wandstärke zwischen den Bürstensaumen benachbarter Tubuli in jedem Fall sicher ausgeschlossen werden. Es kommt hinzu, daß auch beim Gesamtdurchmesser von der Annahme kreisrunder Querschnitte ausgegangen werden mußte. Diese Schwierigkeiten sind vor allem hinsichtlich eventueller systematischer Fehler bei Berechnung der Querschnittsfläche zu berücksichtigen (s. weiter unten).

### *Diurese und Tubulusdimensionen*

Die auflichtmikroskopisch ermittelten Änderungen der Tubulusdimensionen bei osmotischer Diurese, speziell der Lumina, stimmen weitgehend mit den Angaben von THURAU u. DEETJEN, am proximalen Tubulus auch mit denen von HANSEN überein. Nach unserer Erfahrung führen isotonische Lösungen von Mannit und Saccharose und selbst Tyrodelösung zu ganz ähnlichen Effekten, wenn ausreichend große Volumina bis zur Erzielung gleicher Diuresegrade infundiert werden. Gemeinsame Ursache der Tubulerweiterungen bei forcierter Diurese ist offensichtlich der intratubuläre Druckanstieg als Folge erhöhter Stromstärke im Tubuluslumen (WIRZ, GOTTSCHALK u. MYLLE).

Die erhöhte Stromstärke entsteht bei osmotischer Diurese vorwiegend über intratubuläre Wasserretention durch schlecht rückresorbierbare Solute, bei Tyrode-Diurese über das glomerulotubuläre Ungleichgewicht infolge Zunahme des Filtratvolumens und/oder Abnahme der Na-Rückresorption. Die stärkere Erweiterung der distalen Tubuluslumina kann durch den größeren Druckanstieg im distalen System erklärt werden (GOTTSCHALK u. MYLLE); vielleicht spielt (im Hinblick auf die später zu besprechende Möglichkeit einer „Entfaltung“ von Tubuli) auch die bei Antidiurese ausnehmend unregelmäßige Form der Tubuli contorti II eine Rolle<sup>1</sup>.

Allgemein wird angenommen, daß der zunehmende intratubuläre Druck bei osmotischer Diurese zu vermehrter Dehnung der Tubuluswand und dadurch zur Lumenerweiterung führt. Die auflichtmikroskopischen Befunde an Gesamtdurchmesser und Querschnittsfläche lassen sich durch diese Annahme allein jedoch nicht befriedigend erklären.

Von anderer Seite war auf Grund histologischer Ergebnisse angenommen worden, daß osmotische Diurese ohne Änderungen der Querschnittsflächen einfach zur Querdehnung der Tubuli führt (BRUNNER u. Mitarb., für distale Tubuli auch BRODIE u. MACKENZIE); Abnahmen der Querschnittsfläche sollten dagegen vorwiegende Längsdehnung anzeigen (BRODIE für proximale Tubuli). Auch in unseren histologischen Schnitten sowie nach Osmium-Fixierung *in vivo* erscheinen die Querschnittsflächen häufig vermindert. Abgesehen davon, daß Längenänderungen histologisch nicht nachzuweisen und die (auflichtmikroskopisch beobachteten) Längenzunahmen nicht sicher mit Längsdehnungen identisch sind, führen Schnittpräparate hier einfach deshalb nicht weiter, weil systematische Fehler (wie vom vorhergehenden Funktionszustand abhängige, unterschiedliche Schrumpfungstendenzen) nicht ausgeschlossen werden können.

<sup>1</sup> Der für die Weite einzelner Tubuli ausschlaggebende Druckgradient Tubuluslumen/Umgangung kann unseres Erachtens ohne Berücksichtigung des Interstitiums nicht zuverlässig angegeben werden. Bisher wurde die Belastung der Kanälchenwandungen aus den jeweiligen hydrostatischen Lumendrucken abgeschätzt. THURAU u. DEETJEN nehmen z. B. an, daß der bei Antidiurese geringere intratubuläre Drucke aufweisende distale Tubulus viel größere Wandstarrheit besitzen müsse als der weniger formbeständige proximale. Nach unserer Beobachtung (STEINHAUSEN und IRAVANI) kommt es bei Wiedereröffnung der „kollabierte“ proximalen Tubuli am antidiuretischen Tier nachträglich auch zum „Kollaps“ der distalen Tubuli, unter Bedingungen also, wo  $\Delta P$  proximales/distales Tubuluslumen nur wenig erhöht sein dürfte (Abb. 4). Mögliche Beziehungen zwischen distalem „Tubulkollaps“ und Pathogenese des akuten Nierenversagens sollen von St. näher geprüft werden.

Unter dem Auflichtmikroskop *in vivo* nahm bei osmotischer und Tyrode-Diurese neben Tubuluslänge und Gesamtdurchmesser fast regelmäßig auch die Querschnittsfläche zu<sup>1</sup> (vgl. THURAU und DEETJEN, die am distalen Tubulus nach Glucosegaben ebenfalls signifikante Zunahmen der Zellquerschnittsfläche fanden). Man müßte daher annehmen, daß die infundierten Lösungen neben einer Tubulusdehnung (und hypertonische Lösungen im Gegensatz zu anderen Geweben) in der Niere zur Vergrößerung des Epithelvolumens führen oder systematische Fehler die auflichtmikroskopische Bestimmung von Tubulusdimensionen bei Antidiurese oder osmotischer Diurese beeinträchtigen.

Systematische Meßfehler etwa infolge Änderung der optischen Verhältnisse bei osmotischer Diurese kommen vor allem beim Gesamtdurchmesser in Frage<sup>2</sup>. Bei konstantem Epithelvolumen, zuverlässiger Bestimmung der Lumendurchmesser an röhrenförmigen Tubuli und einer echten Längsdehnung von rund 7,5 bzw. 13% müßten diese Meßfehler am proximalen bzw. distalen Tubulus bei Antidiurese rund -6 bzw. -12% oder bei osmotischer Diurese +6 bzw. +12% betragen. Die oben angeführten Kontrollmessungen schließen derartige systematische Fehler nicht mit Sicherheit aus.

Die Beobachtung, daß die Wandstärke der proximalen und distalen Tubuli bei osmotischer und Tyrode-Diurese im Auflichtphotogramm nicht oder wesentlich weniger abnimmt als bei einfacher Querdehnung zu erwarten, führt — neben Epithelschwellung und systematischen Fehlern — auf eine dritte Interpretation: Statt anzunehmen, zwei entgegengesetzte Effekte verschiedener Ursachen (Quer- und Längsdehnung = Abnahme, Epithelschwellung = Zunahme der Wandstärke) würden sich gegenseitig aufheben, könnte die Tubuluserweiterung bei osmotischer Diurese auch durch Annäherung an echte Röhrenform erklärt werden („Entfaltung“ von Tubuli und/oder stärkere Abrundung ovaler Querschnitte infolge Anstiegs der Lumendrücke). Bei konstanter oder relativ wenig verminderter Wandstärke würden sich daraus fälschlicherweise Zunahmen des Epithelquerschnitts errechnen.

Ähnlich wäre anstatt echter Längsdehnung für die Längenzunahme bei osmotischer Diurese eine „Streckung“ der Tubuli zu erwägen, die bei der Berechnung des neuen Epithelvolumens nicht zusätzlich berücksichtigt werden dürfte. Mit diesen Deutungen würde übereinstimmen, daß die unter Annahme echter Dehnung errechnete Vergrößerung des Epithelvolumens am distalen Tubulus, der auch im Auflicht meist unregelmäßige Formen aufweist, deutlicher war als beim proximalen (vgl. die Querschnittsflächen bei THURAU u. DEETJEN).

Möglicherweise sind an den Änderungen der Tubulusdimensionen bei osmotischer Diurese verschiedene Faktoren wie Dehnung und „Entfaltung“ der Tubuli sowie Epithelschwellung beteiligt. Ihr jeweiliger Anteil kann zur Zeit aber nicht angegeben und auch von eventuellen systematischen Fehlern der Auflichtmikroskopie nicht sicher abgetrennt werden. Die Bedeutung einer Vacuolisierung proximaler Tubulusepithelien (vgl. u. a. MAUNSBACH u. Mitarb.) muß im Rahmen dieser Überlegungen ebenfalls noch offengelassen werden.

Die *postmortalen Veränderungen* der Tubulusdimensionen, als Fehlerquelle histologischer Methoden vor allem beim proximalen Tubulus von Bedeutung, hängen jeweils eng mit Menge und Beschaffenheit des bei Unterbrechung der

<sup>1</sup> Länge und Umfang der proximalen Tubuli änderten sich dabei — wie für engverschlüpfene und gegeneinander verankerte Röhrchen bei erhaltenem Durchfluß nicht anders zu erwarten — größtenteilsmäßig durchaus ähnlich. Die stärkere Zunahme des Gesamtdurchmessers bei distalen Tubuli steht mit dieser Erwartung wegen ihrer geringeren Beteiligung am Aufbau des Rindenlabyrinths nicht im Widerspruch. Bei Aortenabklemmung wurden umgekehrt häufig Verminderungen der Querschnittsfläche trotz Längenabnahme gefunden.

<sup>2</sup> Da bei osmotischer Diurese Hämatokritwerte um 15% gemessen wurden, mußte z. B. an eine geringere Verdeckung der Außenkonturen durch subkapsuläre Capillaren gedacht werden.

Filtration im Kanälchensystem befindlichen Tubulusurins zusammen. Die proximalen Tubuli einer *antidiuretischen Niere* enthalten vor der Abklemmung bei 310—350 g schweren Ratten rund 150  $\mu\text{l}$ , bei der Katze rund 490  $\mu\text{l}$  Tubulusurin (Nierengewicht 1,2 bzw. 7 g, 30600 bzw. 15200 Nephren/g Niere [H. W. SMITH] Hauptstücklänge 1 bzw. 2 cm [SPERBER], Lumendurchmesser im Mittel 22,8 bzw. 17,2  $\mu$ ). Nach der Abklemmung errechnen sich aus den proximalen Tubulusdimensionen Restvolumina von 10 bzw. annähernd 0  $\mu\text{l}$ . Da die distalen Tubuli bei Aortenabklemmung praktisch konstant bleiben und die Diurese beim Kontrolltier schon unmittelbar nach der Abklemmung sistiert, kommt eine Verschiebung von Tubulusurin in distaler Richtung als Erklärung für den „Kollaps“ der proximalen Tubuli nicht in Frage. Rückfluß in die Kapselräume scheidet auf Grund des relativ geringen Glomerulumvolumens von rund 30 bzw. 230  $\mu\text{l}/\text{Niere}$  vor allem bei der Ratte aus. Daher trifft offensichtlich die von SWANN u. Mitarb. sowie HANSSEN und ULLRICH geäußerte Vermutung zu, daß bei Antidiurese auch nach Unterbrechung der Nierendurchblutung noch Rückresorptionsprozesse ablaufen<sup>1</sup>. Die Menge der rückresorbierten Flüssigkeit (praktisch identisch mit dem Inhalt der proximalen Tubuluslumina *in vivo*) würde nach unserer Berechnung bei der Katze rund 490  $\mu\text{l}$ , d. h. 7%, bei der Ratte 140  $\mu\text{l}$ , d.h. rund 12% des Nierengewichts betragen und hier mit den Angaben von HANSSEN über den postmortalen Wasserverlust der Mäuseniere sowie mit dem Verhältnis Nierengewicht/„diluting fluid“ nach SWANN recht gut übereinstimmen. Die von HEIMBURG und OCHWADT ermittelte Abnahme der Nierenmasse an Erythrocytenfreier Flüssigkeit nach Blutdrucksenkung und Adrenalininjektion liegt in der gleichen Größenordnung: die angegebene Halbwertszeit von etwa 16 sec darf als Beweis dafür angesehen werden, daß es sich auch bei dieser „transversalen Flüssigkeitsverschiebung“ im wesentlichen um den proximalen „Tubulkollaps“, d. h. um das Abfließen des reabsorbierten „proximalen Harnvolumens“ handelt.

Das postmortale Reabsorbat läuft nach SWANN mit dem venösen Nierenblut ab. Bei Hilusligatur, die an Katzen histologisch zu gleichen Tubulusdimensionen führte wie Entnahme und Durchtrennung der Nieren, dürfte es vor allem in den größeren Nierenvenen liegenbleiben.

Die von SWANN beschriebene postmortale Erweiterung des Interstitiums wurde weder an Gefrierschnitten noch im Auflichtmikroskop beobachtet<sup>1</sup>. Hier erscheinen weitere Versuche mit zuverlässigeren Methoden, unter anderem zur Abschätzung der interstitiellen Drucke, erforderlich. Da die proximalen Lumendurchmesser wahrscheinlich durch aktive „postmortale“ Rückresorptionsvorgänge vermindert werden, kann der Ausdruck proximaler Tubulus „kollaps“ aber jetzt schon als lediglich phänomenologisch zutreffend gelten.

Bei *Tyrodeinfusion* faßt das erweiterte Hauptstück großer Ratten anstatt rund 150 etwa 300  $\mu\text{l}$  Tubulusurin. Da auch dieses größere „proximale Harnvolumen“ bei Aortenabklemmung nur um rund 140  $\mu\text{l}$  reduziert wird, ist anzunehmen, daß die bei Antidiurese zum „Tubulkollaps“ führende postmortale Rückresorption durch rasche Erschöpfung der Energievorräte beschränkt ist, und zwar auf einen Wert, der zufällig dem „proximalen Harnvolumen“ bei Antidiurese, d. h. etwa 10% des normalerweise pro min anfallenden Filtratvolumens entspricht (vgl. Tabelle 6). Dadurch wird verständlich, daß auch kleine Zunahmen der intratubulären Stromstärke mit entsprechend geringer Tubulerweiterung und vielleicht auch geringgradige Abnahmen der (Na)-Rückresorption im histo-

<sup>1</sup> Vgl. dagegen PARKER, SWANN u. SINCLAIR.

logischen Bild zu „offenen“ Lumina führen (Clearance-Versuche, einzelne anti-diuretische Tiere).

Bei *osmotischer Diurese* ist die an Hand von Tubulusdimensionen errechnete postmortale Rückresorption wesentlich geringer als bei Antidiurese und Tyrode-diurese — wie umgekehrt der proximale „Tubuluskollaps“ offenbar durch die schlechte Rückresorbierbarkeit von Mannit weitgehend verhindert wird.

Bei Mannitinfusion steigt die im Hauptstück befindliche Flüssigkeitsmenge an großen Ratten von 150 im Mittel auf 215  $\mu\text{l}$ , bei der Katze von 500 auf rund 1200  $\mu\text{l}$  an und wird durch Aortenabklemmung nur auf 180 bzw. 500—900  $\mu\text{l}$  reduziert. Setzt man die nach der Abklemmung noch abfließende Endharnmenge ein, so kommt man bei der Ratte auf mögliche Rückresorptionswerte von 0—30  $\mu\text{l}$ , bei der Katze von rund 200  $\mu\text{l}$ . Dieser Wert liegt unter dem von HANSSEN bei osmotischer Diurese ermittelten postmortalen Wasserverlust, ähnlich wie die Zunahme des „proximalen Harnvolumens“ durch die Mannitinfusion geringer ist, als die des Nierengewichts.

Die nach Ablauf der frühen postmortalen Veränderungen ermittelten Tubulusdimensionen werden nach unseren Ergebnissen wesentlich vom Verhältnis Lumenweite in vivo/postmortale Rückresorption abhängen. Die postmortale Rückresorption als solche kann durch die Transportfähigkeit der im Primärharn gelösten Stoffe und die Stoffwechselleage des Tubulusepithels vor Unterbrechung der Nierendurchblutung modifiziert werden. Unter pathologischen Verhältnissen könnten histologisch ermittelte Tubulerweiterungen z. B. durch vermehrte Belastung mit schlecht resorbierbaren Soluten bedingt sein (vgl. HANSSEN), nach unserer Erfahrung mit Tyrodelösung aber auch durch vermehrte Filtration oder verminderte Rückresorption von Natrium zustande kommen.

### Zusammenfassung

An narkotisierten Ratten und Katzen wurde die Nierenoberfläche mit dem Auflichtmikroskop photographiert und so der Lumendurchmesser und der Gesamtdurchmesser proximaler und distaler Tubuli bestimmt. Bei *Antidiurese* beträgt der proximale Lumendurchmesser von 70 g schweren Ratten in vivo  $16,4 \pm 1,8 \mu$ , bei 300 bis 330 g schweren Ratten  $22,8 \pm 0,7 \mu$  und bei Katzen  $17,2 \pm 0,7 \mu$ . Nach Unterbrechung der glomerulären Filtration (Aortenabklemmung oder Hilusdurchtrennung) kommt es innerhalb von 20 bis 120 sec zum Kollaps der proximalen Tubuli, während die distalen Tubuli offen bleiben; dieser Kollaps proximaler Tubuli bei Antidiurese wird mit einer auch postmortal noch ablaufenden Rückresorption von Tubulusurin erklärt.

Starke *Tyrode- oder Mannitdiurese* führt infolge intratubulären Druckanstieges in vivo zu einer mäßigen Erweiterung der proximalen und einer beträchtlichen Erweiterung der distalen Tubuli. Ein Kollaps proximaler Tubuli bei Unterbrechung der Filtration wird hier vermisst.

Infolge des postmortalen Tubuluskollapses ergeben sich ohne osmotische Belastung bei der üblichen *histologischen Darstellung* viel zu kleine Werte für das proximale Tubuluslumen. Deshalb findet man bei fehlendem Kollaps unter Tyrode- bzw. Mannitdiurese irrtümlich eine massive „Tubulusdilatation“. Darüber hinaus zeigen die einzelnen histologischen Verfahren noch spezifische Artefakte, welche bei osmotischer Diurese und Antidiurese meist verschieden sind.

Bei osmotischer Diurese wurde ferner im Auflichtmikroskop eine Zunahme des Epithelvolumens beobachtet, welche im histologischen Bild fehlt.

## Incident-Light Microscopy and Histology of Renal Tubule Size under Variable Conditions of Diuresis

### Summary

The surfaces of kidneys of anesthetized rats and cats were photographed with the incident-light microscope, and the diameter of the lumen and that of the whole tubuli contorti I and II were measured. During *anti-diuresis* the diameter of the lumen of the tubuli concorti of 70 gm rats was  $16.4 \mu \pm 1.8 \mu$ ; for rats weighing 300—330 gm the lumen measured  $22.8 \mu \pm 0.7 \mu$ , and for cats  $17.2 \mu \pm 0.7 \mu$ . An interruption of glomerular filtration (by compression of the aorta or by excision of the kidney) during anti-diuresis led to a collapse of the tubuli contorti I within 20 sec. The tubuli contorti II, however, remained open. This collapse of the tubuli contorti I could be explained by a continuing resorption of urinary filtrate.

Intense *diuresis induced by infusions of Tyrode's or mannitol solutions* led to a moderate dilatation of the tubuli contorti I, and to a more marked dilatation of the tubuli contorti II. These changes probably were due to an increase in the intratubular pressure. A collapse of the tubuli contorti I was not observed with an interruption of the glomerular filtration in diuretic animals.

When conventional histological methods were used in the absence of osmotic diuresis, the values for the diameters of the tubuli contorti I were much too small due to the collapse of the tubules postmortem. Thus, in the absence of collapse during Tyrode or mannitol diuresis a massive „tubular dilatation“ was incorrectly observed. In addition, some of the histological procedures possessed specific inherent artefacts which varied usually with osmotic diuresis or anti-diuresis. Furthermore, with osmotic diuresis an increase in the volume of the epithelial cdl's was observed under incident-light microscopy but was not evident in the histological preparations.

### Literatur

- BOHLE, A., CH. HERFARTH u. H. J. KRECKE: Beitrag zur Morphologie der Niere beim akuten Nierenversagen. *Klin. Wschr.* **38**, 152—164 (1960).
- CH. ATZLER, R. SANWALD, E. KLESMMANN u. J. PLEWA: Beitrag zur Morphologie der Niere bei osmotischer Diurese. *Z. ges. exp. Med.* **135**, 481—504 (1962).
- BRODIE, T. G., and J. J. MACKENZIE: On changes in the glomeruli and tubules of the kidney accompanying activity. *Proc. roy. Soc. B* **87**, 593—609 (1914).
- BRUNNER, H., G. KUSCHINSKY, G. PETERS u. H. VORHERRE: Veränderungen der Form der Tubuli und des Wassergehaltes der Nieren bei der Mannit- und Sulfatiurese der Ratte. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* **233**, 57—71 (1958).
- GOTTSCHALK, C. W., and M. MYLLE: Micropuncture study of pressures in proximal tubules and peritubular capillaries of the rat kidney and their relation to ureteral and renal venous pressures. *Amer. J. Physiol.* **185**, 430—439 (1956).
- — Micropuncture study of pressures in proximal and distal tubules and peritubular capillaries of the rat kidney during osmotic diuresis. *Amer. J. Physiol.* **189**, 323—328 (1957).
- HANSSEN, O. E.: Early post mortem renal changes studied in mice with one kidney exteriorized. 1. The reliability of the experimental method as evaluated by the diuretic response to mannitol and sodium ferrocyanide. *Acta path. microbiol. scand.* **49**, 280—296 (1960).
- Early post mortem renal changes studied in mice with one kidney exteriorized. 2. The functional and the early post mortem morphology of the kidney. *Acta path. microbiol. scand.* **49**, 297—320 (1960).

- HEIMBURG, P., u. B. OCHWADT: Über Änderungen von Gewicht und venösem Hämatokrit der Niere als Ausdruck transversaler Flüssigkeitsverschiebung. *Pflügers Arch.* **273**, 62—70 (1961).
- MAUNSBACH, A. B., S. C. MADDEN and H. LATTA: Light and electron microscopic changes in proximal tubules of rats administration of glucose, mannitol, sucrose, or dextran. *Lab. Invest.* **11**, 421—431 (1962).
- PARE, M. V., H. G. SWANN and J. G. SINCLAIR: The functional morphology of the kidney. *Tex. Rep. Biol. Med.* **20**, 425—445 (1962).
- PEASE, D. C.: Electron microscopy of the tubular cells of the kidney cortex. *Anat. Rec.* **121**, 723—743 (1955).
- SCHUBERT, G. E., E. BÜRGER u. A. BOHLE: Zur dynamischen Morphologie des Nephrons nach Injektion verschiedener osmotischer Diuretika. *Z. Kreisl.-Forsch.* **51**, 1014—1032 (1962).
- SMITH, H. W.: The kidney, structure and function in health and disease. New York: Oxford University Press 1951.
- SPERBER, J.: Studies on the mammalian kidney. *Zool. Bidr. Uppsala* **22**, 249—431 (1944).
- STEINHAUSEN, M.: Eine Methode zur Differenzierung proximaler und distaler Tubuli der Nierenrinde von Ratten *in vivo* und ihre Anwendung zur Bestimmung tubulärer Strömungsgeschwindigkeiten. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **277**, 23—35 (1963).
- Farbstoffströmungen in Harnkanälchen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* (im Druck).
- , u. J. IRAVANI: Das Tubuluslumen der Ratte *in vivo* bei verschiedenen Diuresezuständen und post mortem. XXII. *Intern. Congr. Physiol. Sci.*, Leiden 1962.
- SWANN, H. G.: The functional distension of the kidney, a review. *Tex. Rep. Biol. Med.* **18**, 566—595 (1960).
- TAUGNER, R., H. HOLE, G. GRIGOLEIT u. U. WAGEMANN: Herstellung geeigneter Gefrierschnitte zur Autoradiographie der Niere in einer Kühlkammer mit eingebautem Mikrotom. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* **234**, 330—335 (1958).
- THURAU, K., u. P. DEETJEN: Kinematographische Untersuchungen am Warmbluternephon. Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl. H. 2, 27—37 (1961).
- ULLRICH, K. J.: Pers. Mitteilungen zit. nach THURAU u. DEETJEN.
- WIRZ, H.: Druckmessung in Kapillaren und Tubuli der Niere durch Mikropunktion. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **13**, 42—49 (1955).
- Der osmotische Druck in den corticalen Tubuli der Rattenniere. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **14**, 353—362 (1956).

Prof. Dr. R. TAUGNER und Dr. M. STEINHAUSEN,  
Physiologisches Institut der Universität,  
69 Heidelberg, Akademiestr. 3